UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES DE PARIS

UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

ANNÉE 1972-1973 *Série E. n° 271*

THÈSE

présentée

A L'UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES
DE L'UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES DE PARIS

pour l'obtention du grade de

Docteur en Pharmacie
(Diplôme d'État)

par

Paul LAFARGUE
Chef de Laboratoire du Service de Santé des Armées

TITRE DE LA THÈSE

Étude analytique des benzo - (f) - diazépines - 1,4
Application à la toxicologie hospitalière d'urgence

soutenue le 01 JUIN 1973

JURY : M. BOURDON, Président
M. JOUANY, M. YONGER } Examinateurs
M. MEUNIER, Examinateur invité

ERRATUM

- Quatrième page des remerciements.
  lire à la 16ème ligne "l'honneur qu'ils nous font"
  et non "l'honneur qu'il nous font".

- Page 13, 16ème ligne : chloro-7 dihydro - 2,3 formyl-1 .....

- Page 14 :
  Dans la formule du composé XVII, remplacer l'atome de carbone n° 4 du cycle hétéroatomique par un atome d'azote.

  Dans la formule du composé XXII, remplacer le groupement méthylénique en position 3 par un groupement - CHOH.

- Page 16 :
  Eliminer la flèche entre les composés XXIII et XXV et la placer entre les composés XXIV et XXV.

- Page 25 :
  - A la place de "composé époxydé fluorescent", lire : "composé oxazirane fluorescent".
  - Dans la formule le carbone 2 porte un groupement OH.

- Page 27 :
  A la place de "chapitre 321", lire "chapitre 3321".

- Page 28 :
  Lire C_1 = méthylamino-2 chloro-5 benzophénone

  C_2 - amino-2 chloro-5 benzophénone.

- Tableau XV :
  Lire "médazépam" et non "médazépal".

UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES DE PARIS

UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

ANNÉE 1972-1973 *Série E. n° 271*

THÈSE

présentée

A L'UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES
DE L'UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES DE PARIS

pour l'obtention du grade de

Docteur en Pharmacie
(Diplôme d'État)

par

Paul LAFARGUE
Chef de Laboratoire du Service de Santé des Armées

TITRE DE LA THÈSE

Étude analytique des benzo - (f) - diazépines - 1,4
Application à la toxicologie hospitalière d'urgence

soutenue le 01 JUIN 1973

JURY : M. BOURDON, Président
M. JOUANY, M. YONGER } Examinateurs
M. MEUNIER, Examinateur invité

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

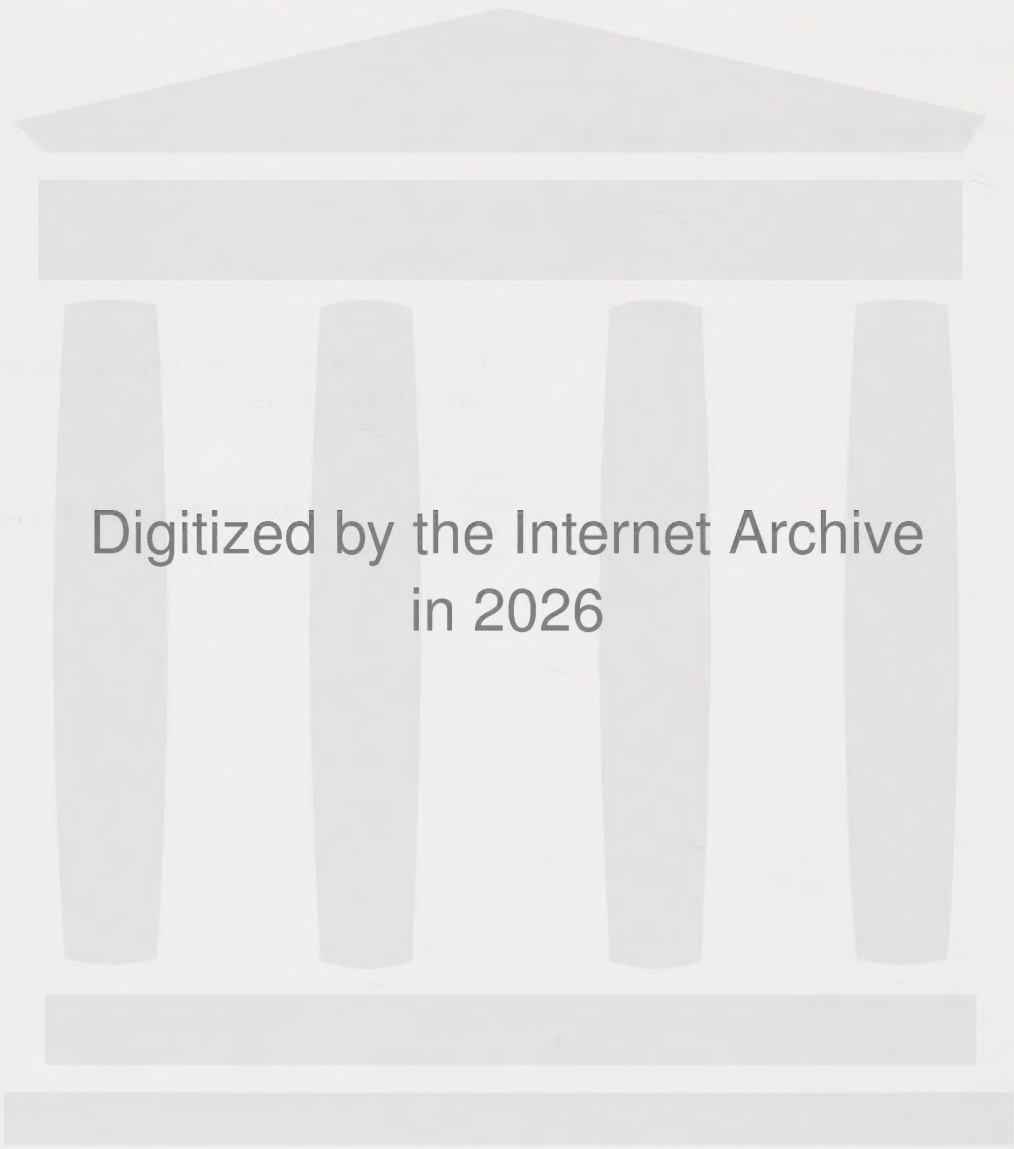
A ma femme

A mes enfants

A tous ceux qui me sont chers

Il n'y a pas de meilleure forteresse que l'affection .....

MACHIAVEL, Le Prince, XX


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41542716_0006

A Monsieur le Médecin Général de 1ère Classe BAYLON
Professeur Agrégé du Val-de-Grâce
Inspecteur du Service de Santé des Armées

Monsieur le Médecin Général de 1ère Classe DARBON
Professeur Agrégé du Val-de-Grâce
Directeur du Service de Santé de la 1ère Région Militaire

Monsieur le Médecin Général de 2ème Classe DESANGLES
Directeur Adjoint du Service de Santé de la
1ère Région Militaire

En hommage respectueux

A Monsieur le Médecin en Chef de 1ère Classe BERENI
Médecin des Hôpitaux
Médecin-Chef de l'Hôpital d'Instruction des Armées PERCY

Monsieur POTIER
Maître de Recherches à l'I.C.S.N. (Gif-sur-Yvette)

Monsieur le Pharmacien-Chimiste en Chef de 2ème Classe PONT
Chef de Laboratoire du Service de Santé des Armées

Monsieur PUSSET
Attaché de Recherches à l'I.C.S.N. (Gif-sur-Yvette)

Monsieur MORINIERE
Chimiste aux Laboratoires FOURNIER (Dijon)

Mes Maîtres Civils et Militaires

En témoignage de reconnaissance

Nous remercions très vivement les Laboratoires CLIN-COMAR, ROCHE et WYETH-BYLA *qui ont fourni gracieusement les échantillons nécessaires à ce travail.*

A notre Président de Thèse

Monsieur le Professeur BOURDON
Professeur à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques
et Biologiques de Paris - Luxembourg
Pharmacien des Hôpitaux de PARIS

qui nous fait le grand honneur d'accepter la présidence de cette thèse

A nos Juges

Monsieur le Professeur JOUANY
Maître de Conférences Agrégé à l'Université de METZ

Monsieur le Professeur YONGER
Maître de Conférences Agrégé à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Paris-Luxembourg
Pharmacien des Hôpitaux de PARIS

qu'ils soient vivement remerciés de l'honneur qu'il nous font

Monsieur le Pharmacien-Chimiste de 1ère Classe MEUNIER
Professeur au Val-de-Grâce

Nous ne saurions en quelques mots lui exprimer notre profond attachement et notre respectueuse gratitude. Nous le remercions pour l'amitié qu'il nous a toujours témoignée et nous sommes très heureux qu'il siège parmi nos Juges.

INTRODUCTION

Parmi les nombreux médicaments utilisés en thérapeutique pour leurs propriétés psychotropes, certains possèdent la structure générale de la benzo-(f)-diazépine-1,4.

Bien que peu nombreux, ces composés ne présentent pas de propriété physiologique majeure commune. En effet, l'introduction de légères modifications, quant aux substituants de la structure chimique fondamentale, peut transformer l'activité pharmacodynamique. C'est ainsi que les benzodiazépines sont utilisées pour leur activité anxiolytique, sédative, hypnotique et qu'un dérivé, dépourvu d'action psychotrope, est employé en thérapeutique pour ses propriétés myorelaxantes.

Si les travaux concernant les essais pharmacologiques et cliniques sont nombreux, parce qu'ils intéressent directement l'utilisation thérapeutique, ceux relatifs à l'étude analytique de ces dérivés sont plus rares. On ne trouve en effet dans la littérature que des travaux isolés et, souvent, fragmentaires.

Face à l'augmentation sans cesse croissante des intoxications aiguës volontaires ou accidentelles, les Laboratoires des Hôpitaux se voient de plus en plus sollicités pour aider à l'identification des médicaments à l'origine d'un coma toxique. Or, si les nombreux travaux concernant les molécules psychotropes ont permis, ces dernières années, de mettre à la disposition de l'Analyste des protocoles opératoires suffisamment simples, rapides et spécifiques qui peuvent être utilisés dans le cadre de l'Analyse Toxicologique Hospitalière d'Urgence, il n'en est pas de même pour l'ensemble des benzo-(f)-diazépines-1,4 qui, jusqu'à présent, n'ont pas fait l'objet d'une étude générale conduisant à l'identification et au dosage de ces composés dans les milieux biologiques.

C'est la raison pour laquelle nous avons entrepris une étude analytique, d'une part de ces composés (et de leurs métabolites qui présentent souvent du point de vue physico-chimique de grandes analogies avec les molécules médicamenteuses proprement dites), d'autre part des produits formés par traitement acide à chaud des substances précédentes.

De plus, nous nous sommes attachés à mettre au point un protocole opératoire d'identification de ces molécules dans les milieux biologiques, en particulier dans les urines.

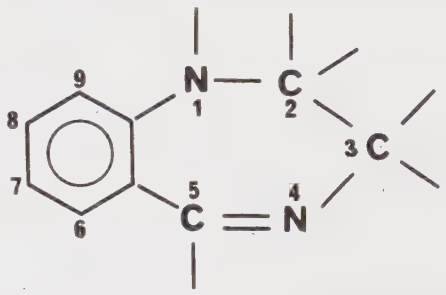
Ces études étaient d'autant plus justifiées que deux molécules benzodiazépiniques récemment introduites en thérapeutique (médazépam, tétrazépam) présentent des substituants du cycle diazépinique s'écartant de ceux des composés antérieurement étudiés.

I - GENERALITES

11 - BENZO-(f)-DIAZEPINES-1,4 UTILISEES EN THERAPEUTIQUE

Parmi les molécules possédant un noyau benzodiazépinique, seuls les dérivés de la BENZO-(f)-DIAZEPINE-1,4 sont utilisés en thérapeutique.

Cette structure de base, représentée ci-contre, est caractérisée par l'accolement à un noyau aromatique d'un cycle hétéroatomique heptagonal, dont deux sommets (1 et 4) sont occupés par des atomes d'azote.

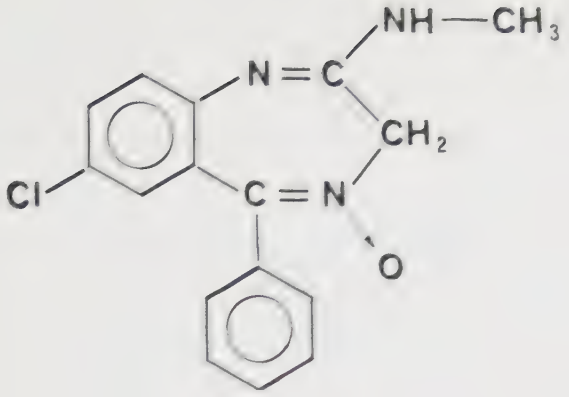


Les tableaux I et II rassemblent les formules, dénominations communes et noms de commercialisation des sept molécules entrant dans la composition de médicaments actuellement commercialisés en France. Les dénominations chimiques citées sont, à l'exception de celle du MEDAZEPAM, les dénominations officielles de la Pharmacopée Française.

Arrêtés du :

- 17 janvier 1964 (DIAZEPAM) ;
- 24 février 1965 (OXAZEPAM) ;
- 16 juin 1966 (CLORAZEPATE - TETRAZEPAM) ;
- 31 mars 1967 (CHLORDIAZEPOXIDE - NITRAZEPAM).

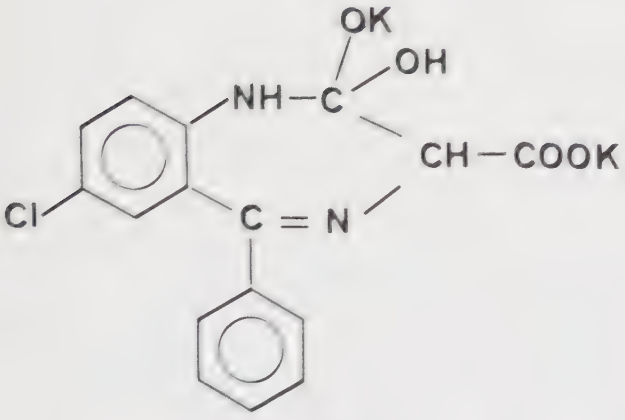
Malgré cela, nous considèrerons que ces dérivés ont tous pour structure de base le noyau de la benzo-(f)-diazépine-1,4.



N - oxyde du chloro - 7 méthylamino - 2 phényl - 5 3 H benzo - (e) - diazépine - 1,4.

CHLORDIAZEPOXIDE (R05.0690)

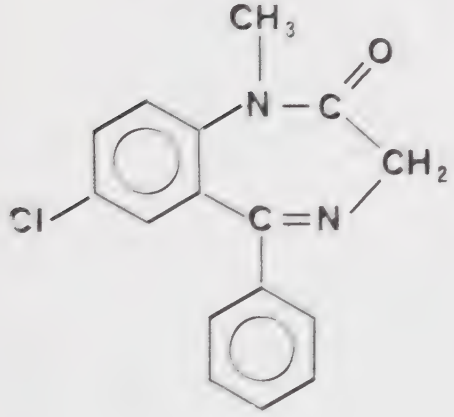
LIBRIUM[MD]



Sel dipotassique du chloro-7 dihydroxy-2,2 phényl-5 carboxy-3 dihydro-2,3, 1H benzo-(f)-diazépine-1,4

CLORAZEPATE (4.306.CB)

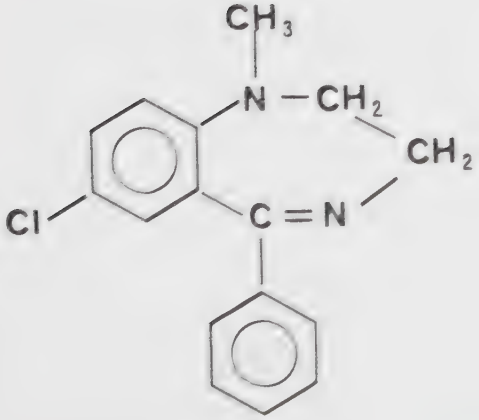
TRANXENE[MD]



chloro-7 dihydro-1,3 méthyl-1 oxo-2 phényl-5 benzo-(f)-2H diazépine-1,4.

DIAZEPAM (R05.2807)

VALIUM[MD]

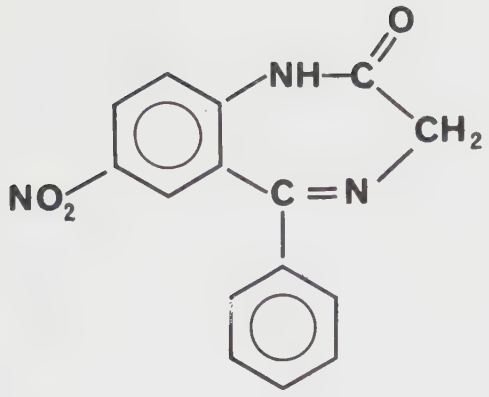


Chloro-7 dihydro-2,3 méthyl-1 phényl-5 benzo-(f)-1H diazépine-1,4.

MEDAZEPAM (R05.4556)

NOBRIUM[MD]

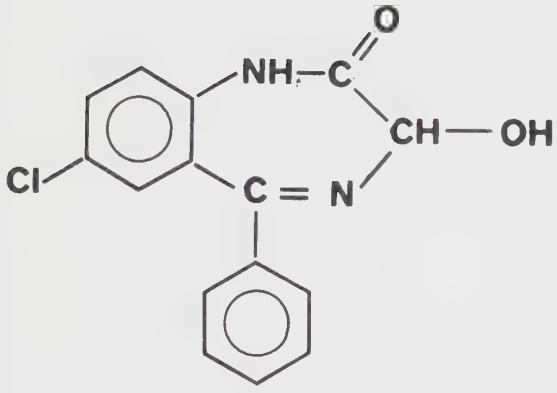
TABLEAU I



Nitro-7 oxo-2 phényl-5 dihydro-2,3 1H benzo-(e)-diazépine-1,4.

NITRAZEPAM (R04.5360)

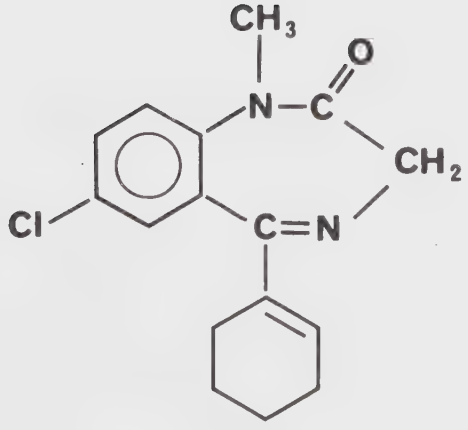
MOGADON[ND]



(chloro-7 hydroxy-3 oxo-2 phényl-5) 1H dihydro-2,3, benzodiazépine-1,4.

OXAZEPAM (8092.CB)

SERESTA[ND]



chloro-7 (cyclohéxène - 1 yl) - 5 méthyl-1 oxo-2 dihydro-2,3 1H benzo-(f)-diazépine-1,4.

TETRAZEPAM (4261.CB)

MYOLASTAN[ND]

TABLEAU II

12 PROPRIETES PHARMACODYNAMIQUES

Le *chlordiazépoxide*, le *clorazépate*, le *diazépam* et *l'oxazépam* sont des psycholeptiques tranquillisants qui exercent en même temps une action dépressive médullaire par blocage synaptique interneuronal avec effet relaxant sur les muscles striés. Ces trois composés ont donc des propriétés anxiolytiques, sédatives, régulatrices du sommeil et musculo-relaxantes. Chacun d'eux présente une "note" pharmacodynamique qui lui est propre, comme cela a été montré par de nombreuses études cliniques comparatives. Ainsi, le caractère sédatif est plus marqué pour le *diazépam* que pour le *chlordiazépoxide*, le *clorazépate* et *l'oxazépam*, ce qui le place dans une position intermédiaire entre les tranquillisants et les neuroleptiques. Le *clorazépate* est essentiellement un anxiolytique. Ainsi que nous le rappellerons plus loin, *l'oxazépam* est le métabolite majeur du *diazépam*, ce qui a été à l'origine de son introduction en thérapeutique.

Le *nitrazépam*, au contraire, présente des propriétés anxiolytiques et musculo-relaxantes secondaires mais une activité hypnotique majeure prédominante. La qualité du sommeil qu'il procure serait très supérieure à celui obtenu avec d'autres hypnotiques. La comparaison des tracés électroencéphalographiques, enregistrés pendant le sommeil physiologique d'une part, et après administration de nitrazépam d'autre part, montre que ce dérivé engendre un sommeil paraphysiologique indiscernable du sommeil naturel. Ce produit induirait et entretiendrait, par des mécanismes originaux, différents de ceux des autres hypnotiques, un sommeil dont les caractères sont très voisins de ceux du sommeil naturel.

Certaines des benzo-(f)-diazépines-1,4, citées précédemment, manifestant, comme nous venons de l'indiquer, des propriétés myorelaxantes, il était logique de chercher à exacerber l'action sélective sur la contracture musculaire. Les recherches en ce domaine ont conduit à la synthèse du *tétrazépam*. Ce composé est doué d'un pouvoir myorelaxant élevé, d'autant plus intéressant qu'il est peu déséquilibrant. Il semble que l'effet myorelaxant du *tétrazépam* soit lié, au moins en partie, à son action sur la formation réti-

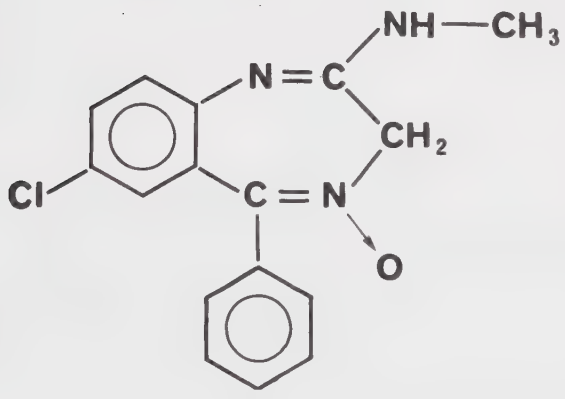
culée mésencéphalique, car il diminue ou supprime totalement la rigidité de décérébration consécutive à la section du névraxe au niveau de l'incision II de SHERRINGTON.

Signalons enfin que le *tétrazépam* produit un effet analgésique contre les douleurs viscérales et les douleurs articulaires.

Le *médazépam*, dernier composé de la série des benzodiazépines introduit en thérapeutique, présente sur le plan pharmacologique une activité essentiellement anxiolytique. En raison d'un effet myorelaxant très modéré et d'une action sédative plus réduite que celle des dérivés antérieurement utilisés, ce composé est d'une prescription plus facile et présente moins d'effets secondaires. Il est donc plus maniable et le résultat anxiolytique recherché est plus aisément obtenu. Son originalité thérapeutique résiderait dans une action élective sur les troubles psychofonctionnels.

13 - RAPPELS CONCERNANT LE METABOLISME DES BENZO-(f)-DIAZEPINES-1,4

CHLORDIAZEPOXIDE (Tableau III)



En 1963, KOECHLIN *(35)* montre que le lactame (V), qui est normalement un produit de dégradation chimique du chlordiazépoxide, est aussi un métabolite, présent dans le sang et l'urine de sujets ayant absorbé ce dérivé à doses élevées. Le même auteur retrouve le chlordiazépoxide dans le plasma 48 heures après l'administration par voie orale d'une dose faible (10 à 30 mg) de ce dérivé. Dans l'urine, 1 % seulement du produit non métabolisé est retrouvé à côté du lactame, métabolite quantitativement important. Après une ingestion de 30 mg, le taux plasmatique est maximum entre 2 et 4 heures après l'absorption (1,3- 2 mcg/ml de plasma).

En 1964, PRIBILLA *(56)*, en recueillant toutes les 12 heures et pendant 264 heures, les urines de six sujets ayant absorbé 15 mg de chlordiazépoxide, montre que 7,5 % de la dose absorbée est retrouvée dans les urines sous forme :

- de chlordiazépoxide (I);
- d'un métabolite résultant de la désamination oxydative du carbone 2 (V);
- de chlordiazépoxide N-acétylé (II);
- de N-déméthyldiazépam (III).

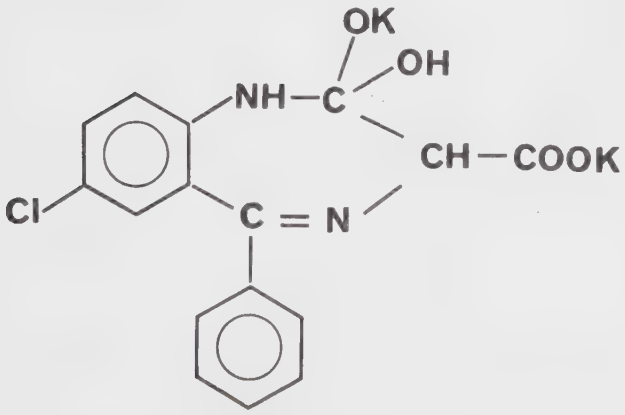
KOECHLIN *(36)* poursuivant l'étude entreprise en 1963 montre également la présence dans les urines de lactame ouvert (VI).

En 1966, SCHWARTZ *(69)* identifie un composé qui serait un intermédiaire logique dans la formation du lactame, le chlordiazépoxide N-déméthylé (IV), également mis en évidence par KAPLAN *(31)*.

Le lactame (V) provenant de la désamination oxydative du chlordiazépoxide N-déméthylé et le lactame ouvert (VI) sont deux métabolites importants *(31 - 70)*.

Enfin, SCHWARTZ *(70)* a montré l'existence de deux dérivés hydroxylés du lactame : le 9-hydroxy lactame et le 5-(4 hydroxyl-phényl)-lactame.

CLORAZEPATE (Tableau IV)



En 1969, GROS et RAVEUX *(24)* ont montré qu'en solution très acide, la forme nonoionisée du clorazépate conduit à la formation de N-déméthyl diazépam (VIII) après libération d'une molécule d'anhydride carbonique. Les études métaboliques, effectuées par ces mêmes auteurs, mettent en évidence la formation de N-déméthyl diazépam (VIII), d'oxazépam (IX) et de dérivés de glucuronoconjugaison de l'oxazépam. Dans les urines, 2 à 6 % du produit non métabolisé peuvent être retrouvés.

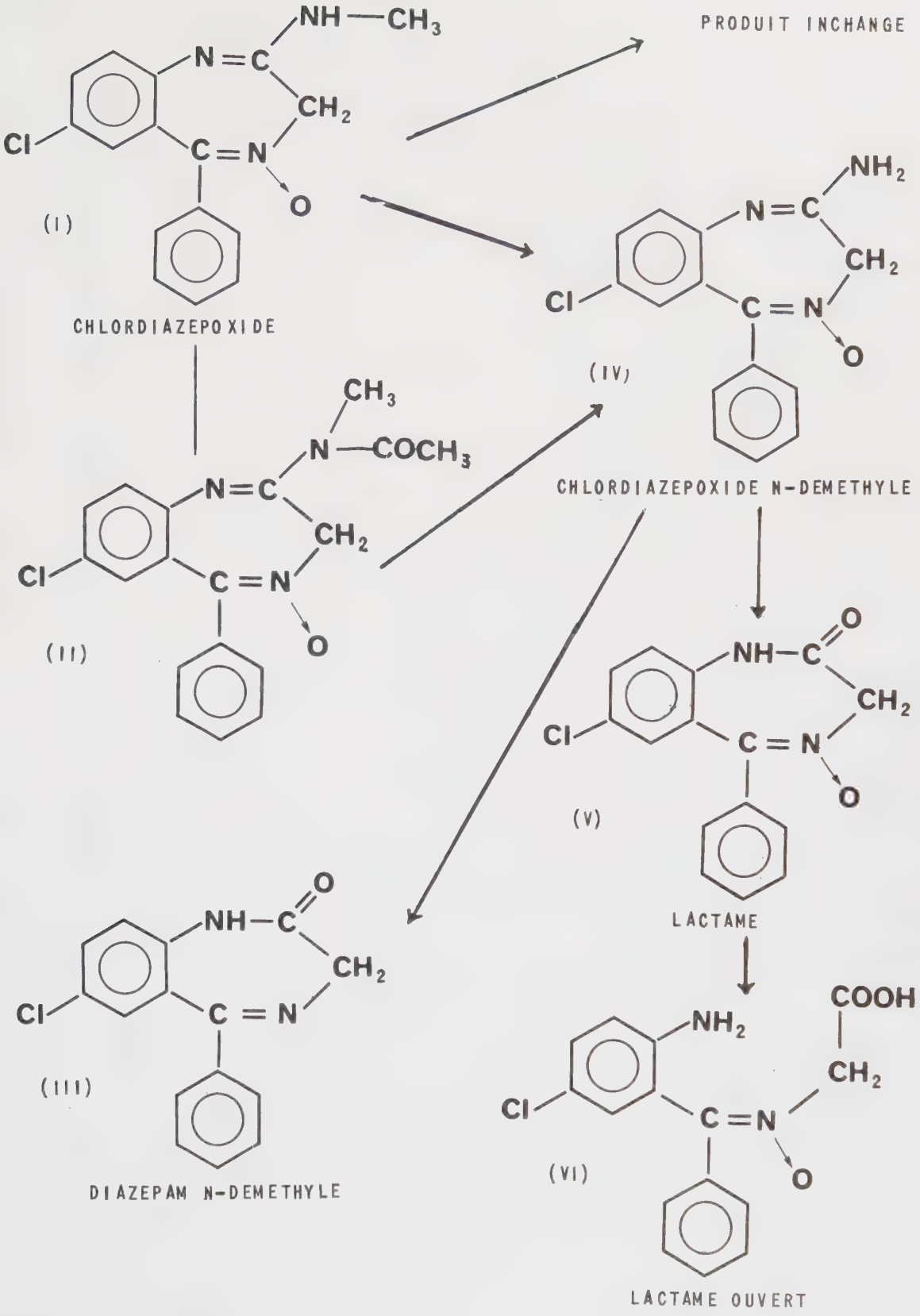


TABLEAU III - *METABOLISME DU CHLORDIAZEPOXIDE*

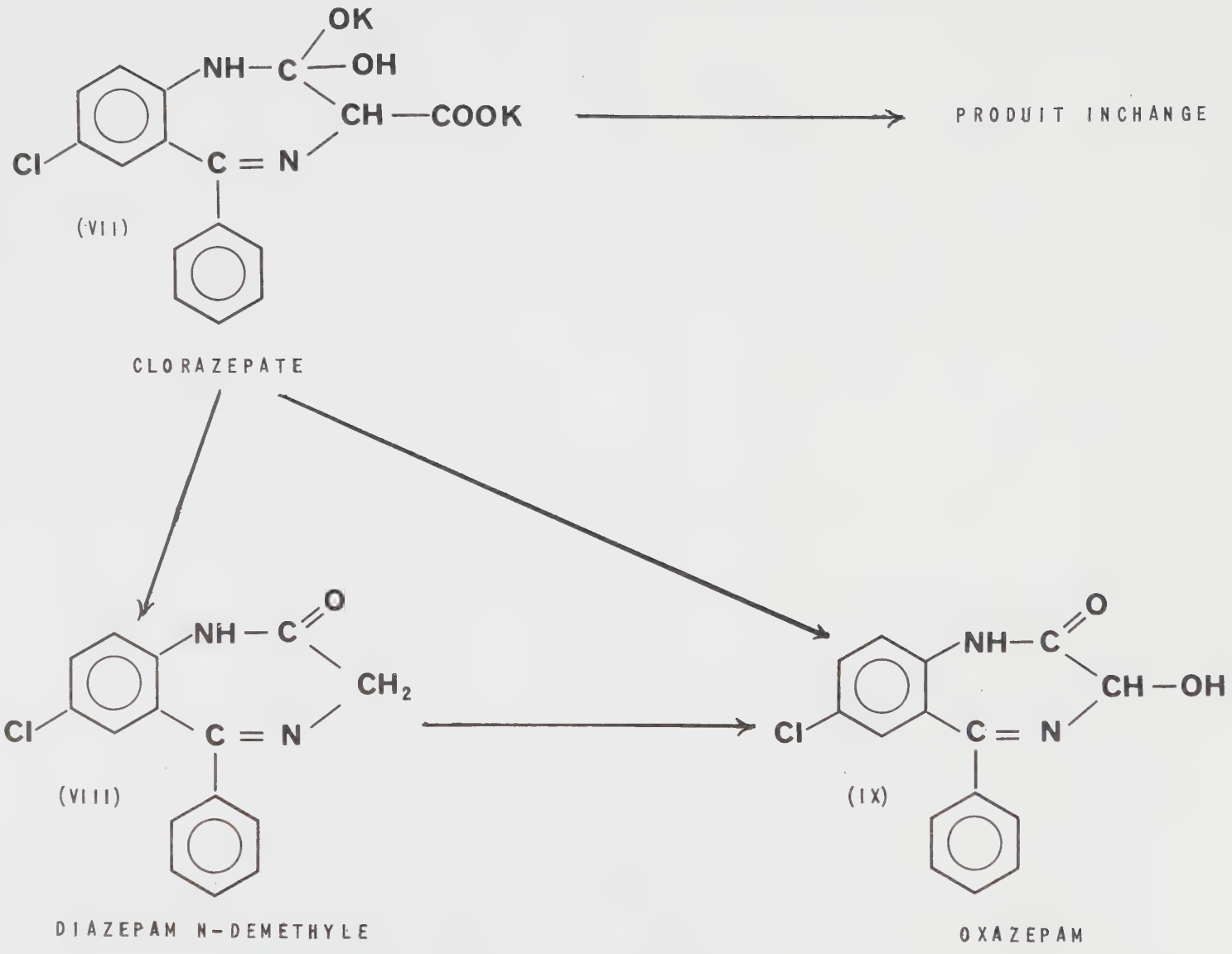
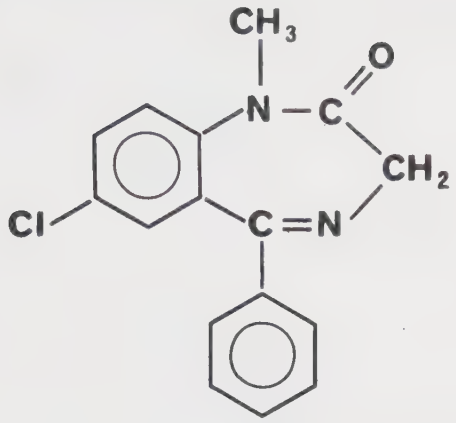


TABLEAU IV - *METABOLISME DU CLORAZEPATE*

DIAZEPAM (Tableau V)



Dès 1964, JOMMI *(26, 27)*, après hydrolyse acide d'urines d'animaux traités par des doses massives de diazépam (600 - 800 mg/kg par voie intrapéritonéale), identifie 4 benzophénones (*cf.* chapitre 222) dont :

- l'amino-2 chloro-5 benzophénone qui objective la présence dans les urines du N_1-déméthyldiazépam (XI),
- l'amino-2 chloro-5 hydroxy-4' benzophénone, dont l'auteur pense qu'elle ne peut provenir que de l'hydrolyse de métabolites conjugués présents dans les urines.

En 1965, RUELIUS *(64)* montre que si dans l'organisme, le diazépam est N-déméthylé, il est aussi hydroxylé ce qui conduit à un composé qui n'est autre que l'oxazépam (XII) [diazépam N-déméthylé et 3- hydroxylé], métabolite majeur retrouvé dans les urines.

SCHWARTZ *(68)* en 1966, SILVA *(73)* en 1967, et MARCUCCI *(47)* en 1970 aboutissent aux mêmes conclusions.

En 1969, Van der KLEIJN *(32, 33)* trouve dans l'urine, l'oxydiazépam (XIII), le déméthyldiazépam et l'oxazépam, confirmant ainsi les étapes métaboliques de la N-1 déméthylation et de la C-3 hydroxylation. D'autre part, il met en évidence la présence dans les urines des dérivés de conjugaisons des métabolites hydroxylés.

Enfin, récemment, VIALA *(79)* a montré, qu'après administration de diazépam à des enfants, le N-déméthyldiazépam apparaît dans le sang après un délai de 5 à 6 heures et peut y être retrouvé pendant plus d'une semaine.

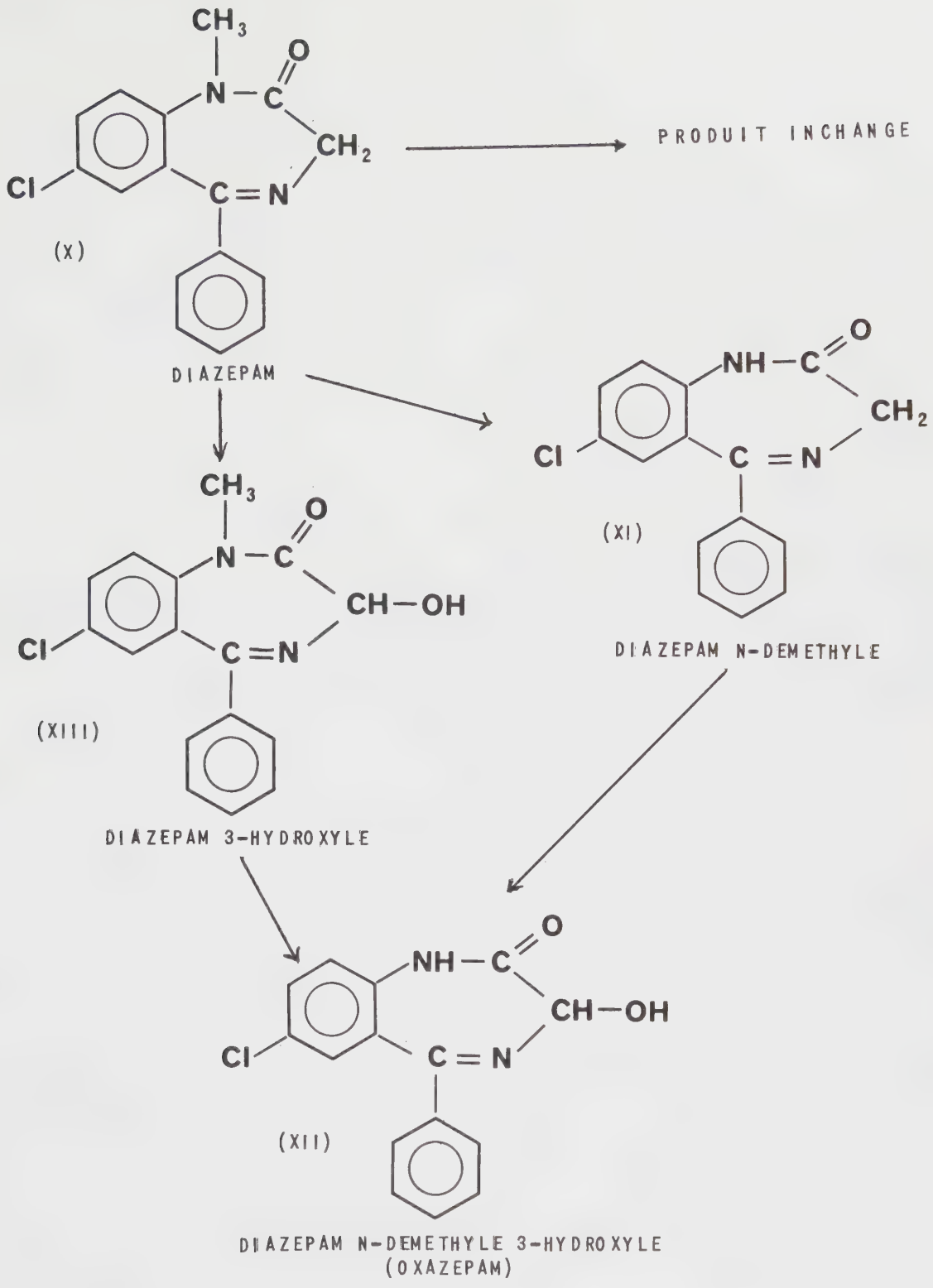
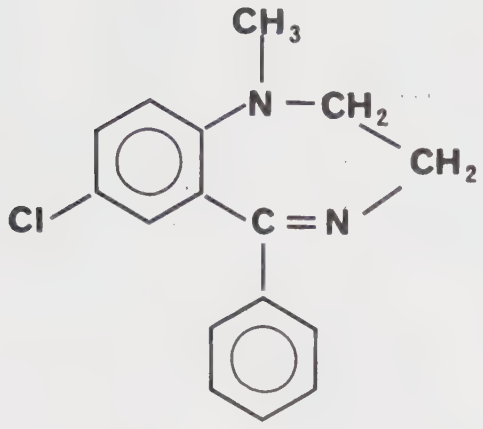


TABLEAU V - *METABOLISME DU DIAZEPAM*

MEDAZEPAM (Tableau VI)



Dès les premiers essais cliniques, RIEDER *(61)* montre l'extrême complexité du métabolisme de cette molécule. Grâce à l'emploi de molécules marquées, cet auteur a identifié dans le plasma, outre le médazépam, le dérivé N-déméthylé (XVI), le dérivé oxo-2 (XVIII) [diazépam] et le diazépam N-déméthylé (XIX). Dans les urines, ces trois composés sont présents, mais on trouve aussi le diazépam hydroxylé en 3 (XXI), l'oxazépam (XXII), la chloro-7 phényl-5 benzodiazépine-1,4 (XVII), la phényl-4 chloro-6 quinazoline (XX) et la chloro-7 dihydro-2,5 formyl-1 phényl-5 1 H benzodiazépine-1,4 (XV).

Cependant si tous ces dérivés sont présents, RIEDER a montré sur le plan quantitatif, que les métabolites principaux sont :

a) dans le plasma ..... : le médazépam;
le médazépam N-déméthylé (XVI);
le diazépam N-déméthylé (XIX).

b) dans l'urine ..... : essentiellement le médazépam et l'oxazepam sous forme conjuguée; l'élimination par les urines représentant au maximum 75 % de la dose ingérée.

En 1970, RANDALL *(59)* et SILVA *(74)*, reprenant les travaux de RIEDER, reconnaissent que le terme de la chaîne métabolique est bien l'oxazépam.

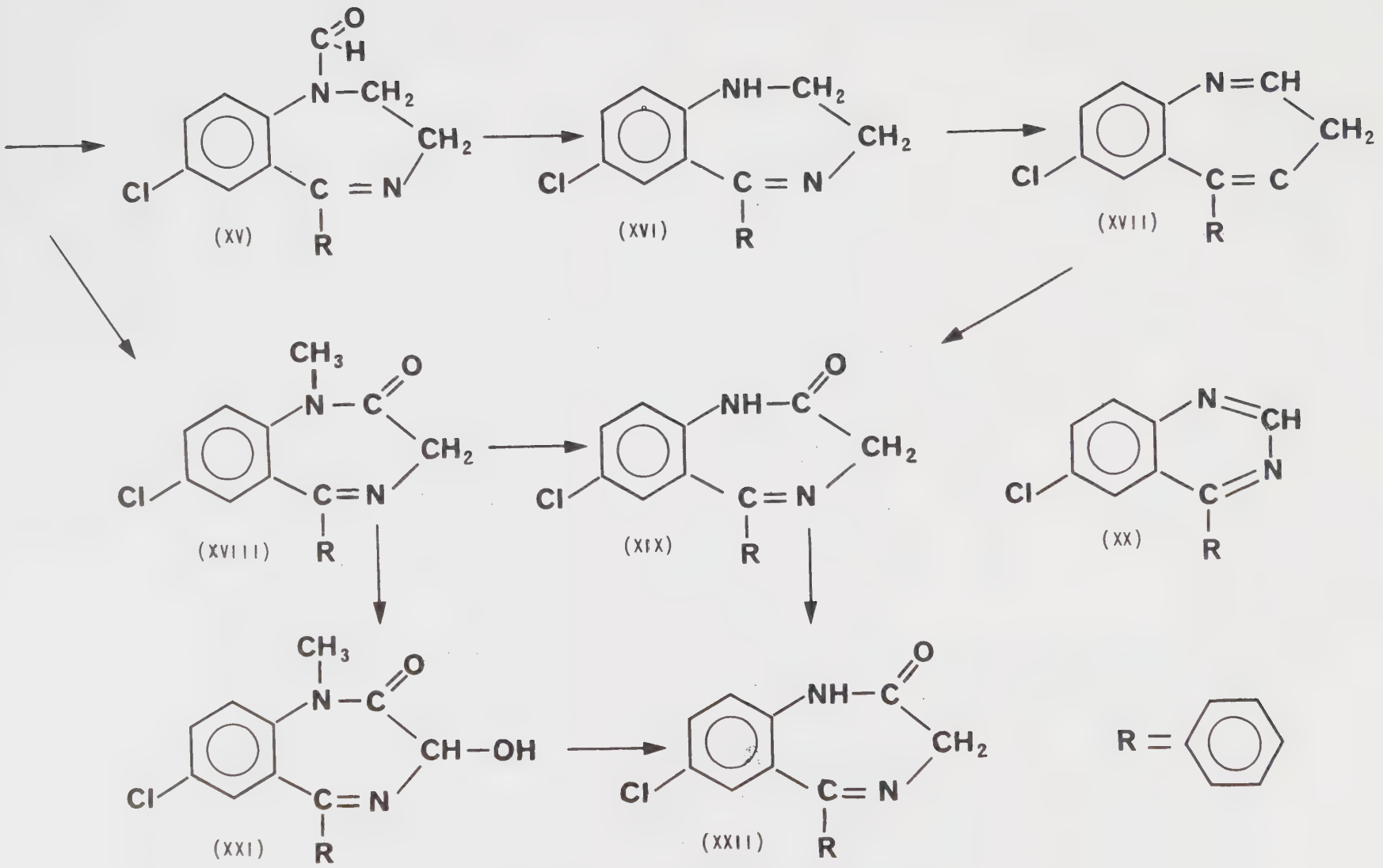
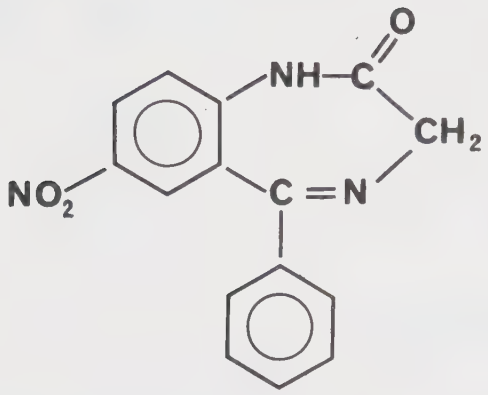


TABLEAU VI - *METABOLISME DU MEDAZEPAM*

NITRAZEPAM (Tableau VII)



Dès 1965, PRIBILLA *(57)* montre après absorption de nitrazépam, la présence dans l'urine de cinq composés différents, qui vraisemblablement sont des métabolites, mais qu'il n'a pas identifiés.

L'année suivante, OELSCHLAGER *(53)* fait remarquer qu'il est possible d'identifier le nitrazépam, de façon simple, par diazocopulation du composé obtenu par réduction du groupement nitré en position 7. L'étude des biotransformations subies par le nitrazépam montre l'apparition dans le sang de deux métabolites importants : le nitrazépam réduit *(XXIV)* et son dérivé d'acétylation ou acétamido-7 nitrazépam (XXV). Ceci est en parfait accord avec les conclusions de RIEDER *(60)* apportées la même année.

TOMPSETT *(78)* en 1968 confirme les résultats précédents et les travaux encore plus récents de BARTOSEK *(3, 4)* n'apportent aucune information complémentaire aux résultats des études métaboliques antérieures et qui viennent d'être rappelées.

Enfin BEYER *(9)* montre qu'après absorption de nitrazépam, on retrouve dans l'urine quatre composés qui sont :

- le nitrazépam intact (traces) ;
- l'amino-7 nitrazépam;
- l'acétamido-7 nitrazépam;
- l'hydroxy-3 amino-7 nitrazépam (XXVI).

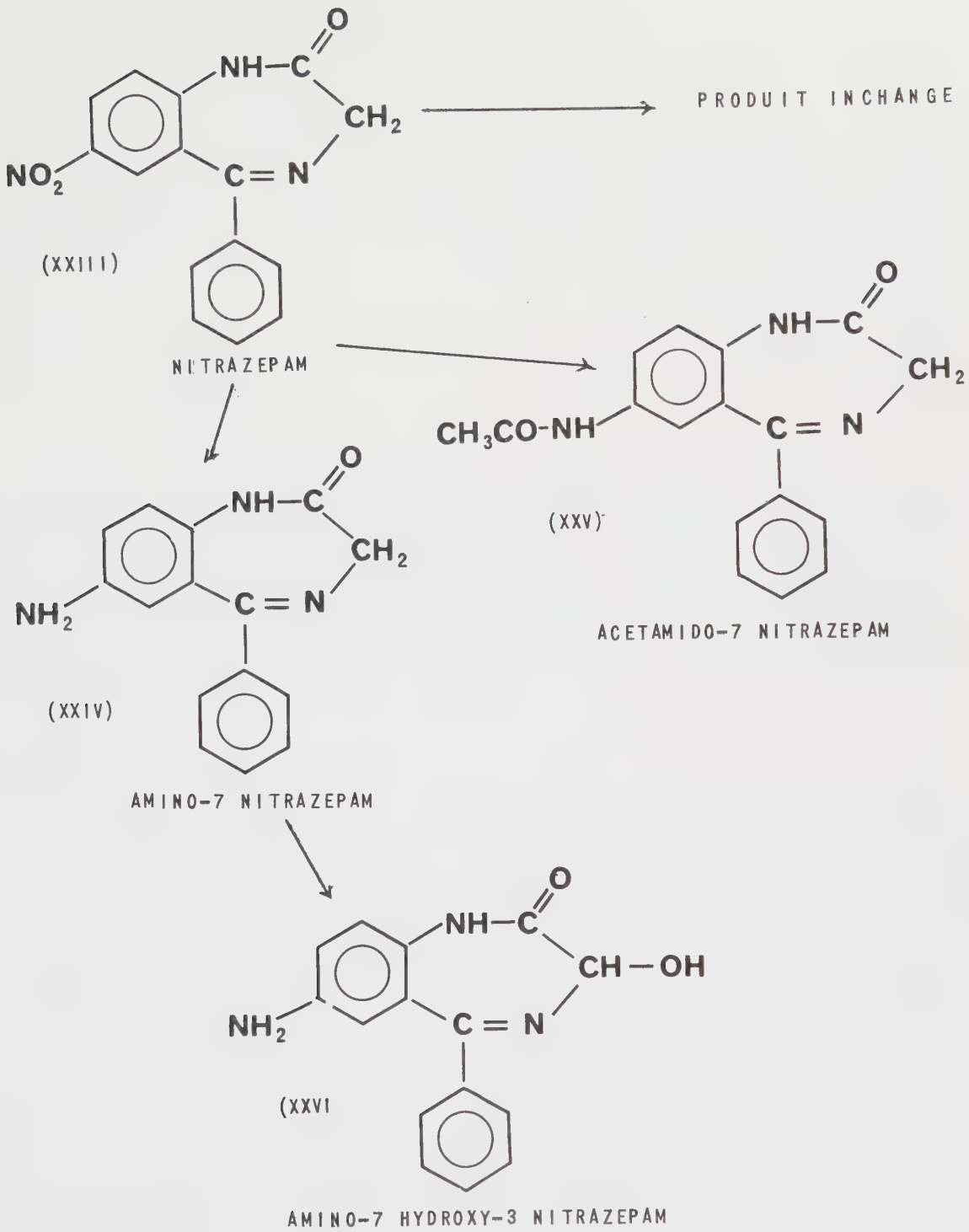
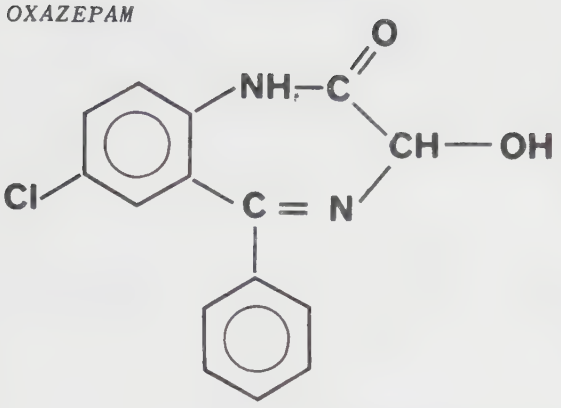


TABLEAU VII - *METABOLISME DU NITRAZEPAM*

OXAZEPAM

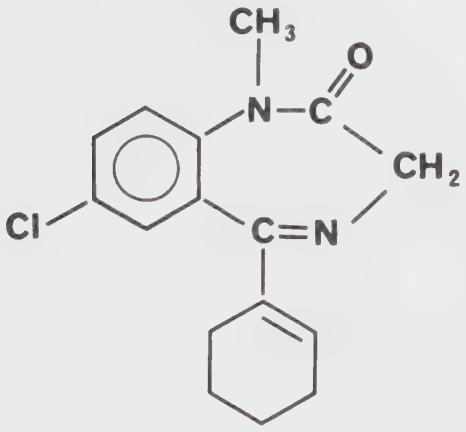


Le métabolisme de ce composé, lui-même métabolite d'autres benzo-(f)-diazépines-1,4, a été étudié par WALKENSTEIN *(80)*. Après administration de la substance, on ne trouve dans les urines, à côté du produit inchangé, qu'un seul métabolite qui, hydrolysé par la bêta-glucuronidase, conduit à l'oxazépam.

En 1969, PELZER *(55)* après avoir montré que le taux sanguin en oxazépam est maximum entre 1 et 2 heures après l'ingestion, retrouve ce composé dans l'urine essentiellement sous forme conjuguée et montre que la forme libre ne représente que le tiers de la quantité éliminée par les urines.

STEIDINGER *(76)* aboutit aux mêmes conclusions mais fait remarquer que la quantité d'oxazépam glucuronoconjugué retrouvée dans les urines est variable, suivant que les urines proviennent de sujets sains ou de malades atteints de cirrhose.

TETRAZEPAM (Tableau VIII)



Avant les résultats que nous rapporterons plus loin, aucun travail n'a été réalisé tant dans le domaine de l'analyse que dans l'étude du métabolisme du tétrazépam.

Comme l'indiquait une note technique du Laboratoire de Commercialisation *(16)*, il semblait logique de considérer que cette molécule devait subir dans l'organisme un métabolisme, voisin de celui du diazépam, conduisant notamment, à la formation de tétrazépam déméthylé (XXX), de tétrazépam 3-hydroxylé (XXIX) et de tétrazépam N-déméthylé et 3-hydroxylé (XXXI) [homologue de l'Oxazépam].

Cette molécule se différencie des six dérivés précédents par la présence sur le carbone 5 d'un radical cyclohéxène.

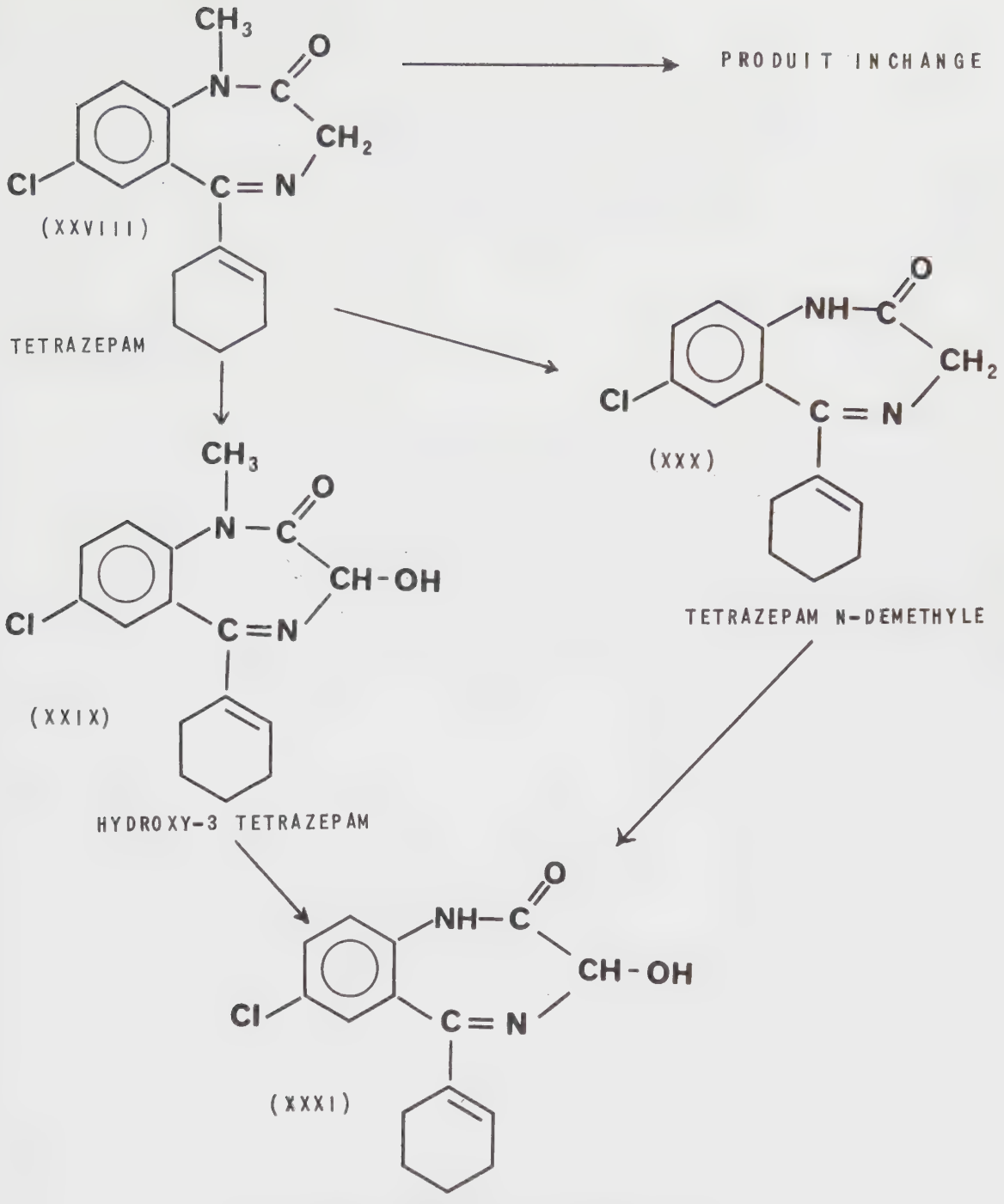


TABLEAU VIII - *METABOLISME DU TETRAZEPAM*

II - RAPPEL DES METHODES DEJA UTILISEES POUR L'ETUDE DES BENZODIAZEPINES-1,4

21 - *GENERALITES*

L'étude analytique des benzo-(f)-diazépines-1,4 présente cette caractéristique qu'elle peut être réalisée en s'adressant, soit directement à ces composés (ou à leurs métabolites qui présentent souvent du point de vue physico-chimique de grandes analogies avec les molécules médicamenteuses dont ils dérivent), soit aux produits formés par hydrolyse acide des substances précédentes.

Nous envisagerons d'abord les différentes méthodes et techniques analytiques déjà mises en oeuvre pour l'étude des benzo-(f)-diazépines-1,4.

22 - *ETUDE QUALITATIVE*

221 - *Benzodiazepines et métabolites*

2211 - Spectrophotométrie d'absorption ultra-violette

Des études fragmentaires relatives au comportement spectrophotométrique d'absorption dans l'ultra-violet des benzodiazépines et de leurs métabolites, ont été antérieurement décrites (tableau IX). Remarquons, comme le souligne d'ailleurs une note technique d'un Laboratoire de Commercialisation *(63)*, que l'exploitation des spectres ne permet pas toujours de différencier une molécule de certains "de ses analogues proches".

ANNEE	AUTEURS	REFERENCES	MILIEUX	PRODUITS ETUDIES
1962	STERNBACH	*77*	Isopropanol	Chlordiazépoxide
1964	KOECHLIN	*34*	HCl 2N	Diazépam
"	OELSCHLAGER	*52*	Méthanol	Diazépam
"	PRIBILLA	*56*	Ether Isopropanol Ethanol Chloroforme	) Chlordiazépoxide
1966	OELSCHLAGER	*53*	Méthanol	Nitrazépam et métabolites
"	SILVA	*73*	HCl 2N	Diazépam et dérivé déméthylé
1967	SCHMITT	*66*	Ethanol à 96°	Tétrazépam et dérivé déméthylé
1968	TOMPSETT	*78*	HCl N et NaOH N	Chlordiazépoxide - Diazépam - Nitrazépam - Nitrazépam réduit
"	FAZZARI	*21*	Ethanol	Oxazépam
"	SHARKEY	*72*	Méthanol acide Ethanol à 95°	Chlordiazépoxide Oxazépam
1969	SCHMITT	*67*	Eau	Clorazépate
"	BEYER	*7*	Méthanol	Nitrazépam et métabolites
"	BEYER	*8*	Ether - Ethanol	Chlordiazépoxide
			Ethanol Chloroforme HCl 0,02 N	) Diazépam
			Méthanol Chloroforme HCl 0,2 N NaOH 0,1 N	) Nitrazépam
			Chloroforme Ethanol NaOH 0,5 N HCl 0,02 N	) Oxazépam
"	SALIM	*65*	Ethanol H_2SO_4 0,1 N	) Chlordiazépoxide) Diazépam - Oxazépam
	Laboratoires CLIN-BYLA	*15*	Ethanol à 96°	Clorazépate
	Laboratoires ROCHE	*62*	HCl 0,1 N	Chlordiazépoxide
	Laboratoires ROCHE	*63*	HCl 2N	Diazépam

TABLEAU IX - *COMPOSITION DES DIFFERENTES SOLUTIONS DECRITES POUR L'ETUDE SPECTROPHOTOMETRIQUE D'ABSORPTION DANS L'ULTRA-VIOLET DES BENZODIAZEPINES ET DE LEURS PRINCIPAUX METABOLITES.*

2212 - Chromatographie sur couche mince d'adsorbant (C.C.M.)

Des études, relatives au comportement chromatographique en couche mince des benzodiazépines et de leurs métabolites, ont été antérieurement décrites (tableau X). On observe en particulier :

- que l'adsorbant est presque toujours le gel de silice,
- qu'aucune étude ne concerne le tétrazépam,
- qu'il ne s'agit que de travaux fragmentaires.

2213 - Chromatographie en phase gazeuse (C.P.G.)

Peu de travaux, utilisant cette élégante technique analytique, ont été réalisés pour l'identification des benzodiazépines.

SILVA *(73)* le premier, a séparé le diazépam de son métabolite N-déméthylé par l'emploi d'une colonne de 2 % de polyester Carbowax 20 M acide téréphtalique (C.B.W. - 20 M - T.P.A.) sur gas - chrom P silanisé 100 - 120 mesh (T de la colonne : 215° C). MAC MARTIN *(45)*, après injection d'une solution éthanolique de chlordiazépoxide, observe deux pics, le premier étant vraisemblablement un produit de décomposition du chlordiazépoxide.
Selon une note technique du Laboratoire de Commercialisation *(15)* il devrait être possible d'identifier le clorazépate en utilisant une colonne de gas - chrom P silanisé recouverte de 2 % de Carbowax - 20 M (température de la colonne: 190° C).

MARCUCCI *(46)*, en employant une colonne de 2 mètres à 3 % d'OV_1 sur gas - chrom Q, sépare le diazépam, deux de ses métabolites, le nitrazépam et l'oxazépam (température de la colonne : 245° C).

ANNEE	AUTEUR	REFERENCE	ADSORBANT	MELANGES SOLVANTS	PRODUITS ETUDIES
1963	PAULUS	*54*	Gel de silice	Benzène – Acétone – Ammoniaque à 25 % (50/10/5) Benzène – Ethanol – Ammoniaque à 25 % (50/10/5)	Chlordiazépoxide
1964	LANGNER	*42*	Gel de silice	Chloroforme Méthanol (60/10) puis chloroforme	Diazépam
1964	PRIBILLA	*56*	Gel de silice	30 mélanges solvants différents	Chlordiazépoxide et métabolites
1965	PRIBILLA	*57*	Gel de silice	Benzène–Méthanol (9,9/0,1) Chloroforme–Acétone (9/1) Méthanol – Acétone – Triéthanolamine (1/1/0,03)	Nitrazépam et métabolites supposés
1965	RIEDER	*60*	Gel de silice	Acétate d'éthyl–n–propanol–diéthylamine (70/30/1) Dichloroéthane–méthanol–ammoniaque (90/10/1) Toluène–acétone–ammoniaque (50/50/1)	Nitrazépam et métabolites
1965	RUELUS	*64*	Gel de silice	Chloroforme – acétone éthanol (8/1/1)	Diazépam et métabolites
1965	SCHWARTZ	*68*	Gel de silice	Heptane–chloroforme–éthanol (10/10/1) puis Heptane–chloroforme–acide acétique–éthanol (5/5/1/0,3)	Diazépam et métabolites
1966	OELSCHLAGER	*53*	Oxyde d Aluminium	Chloroforme–méthanol acide acétique (97/5/1)	Nitrazépam et métabolites
1966	OELSCHLAGER	*53*	Oxyde d aluminium	Chloroforme – méthanol (98/2) Chloroforme – acétone (90/10)	Chlordiazépoxide – Diazépam et Nitrazépam
1966	SCHWARTZ	*69*	Gel de silice	Acétate d'éthyle – éthanol (9/1) Heptane – chloroforme – éthanol (1/1/1)	Chlordiazépoxide et métabolites
1966	SILVA	*73*	Gel de silice	Chloroforme–acétone (9/1) Chloroforme–heptane–éthanol (10/10/1) puis Chloroforme–heptane–acide acétique–éthanol (5/5/1/0,3)	Diazépam et métabolites
1967	HERMANS	*25*	Gel de silice	Chloroforme–éther (3/1) Acétate d'éthyle–n–hexane ammoniaque à 14% (60/27/25)	Chlordiazépoxide – Diazépam Nitrazépam et Oxazépam
1968	TOMPSETT	*78*	Gel de silice	n–Heptane – chloroforme – éthanol (20/20/1)	Nitrazépam et nitrazépam réduit.
1969	EICH	*18*	Gel de silice	Méthanol – n–butanol (60/40)	Chlordiazépoxide
1969	KLEIJN	*32*	Gel de silice	Heptane – chloroforme – éthanol (5/5/1) Benzène – éthanol à 96° (8–5/1) ou Chloroforme – éthanol (9/1)	Diazépam et métabolites

ANNEE	AUTEUR	REFE-RENCE	ADSORBANT	MELANGES SOLVANTS	PRODUITS ETUDIES
1969	LAUFFER	*43*	Gel de silice	Chloroforme-acétone-méthanol (70/25/5) Cyclohexane - diéthylamine - benzène (80/15/5)	Médazépam et métabolites
1969	BEYER	*7*	Gel de silice	Toluène - acétone - ammoniaque (50/50/1) Acétate d'éthyle-n-propanol-diéthylamine (70/30/1) Méthanol - chlorure d'éthylène - ammoniaque (10/90/1)	Nitrazépam et métabolites
1969	WEIST	*81*	Gel de silice	Chloroforme - acétone - méthanol (7/2/1)	Chlordiazépoxide - Diazépam Nitrazépam et Oxazépam
1970	SILVA	*74*	Gel de silice	Chloroforme-heptane-éthanol (10/10/1) puis chloroforme - acétone (90/10)	Diazépam, Médazépam et métabolites.

TABLEAU X : *NATURE DE L'ADSORBANT ET COMPOSITION DES MELANGES DE MIGRATION DEJA DECRITS POUR L'IDENTIFICATION CHROMATOGRAPHIQUE SUR COUCHE MINCE DES BENZODIAZEPINES ET DE LEURS PRINCIPAUX METABOLITES.*

En 1970, FOSTER *(22)*, travaillant à 205° C avec une colonne à 3 % de SE_{30} sur chromosorb W silanisé, identifie de façon simple, rapide et précise le chlordiazépoxide et le diazépam.

Dans une communication, (parue postérieurement à la publication de nos premiers résultats), SILVA *(74)* fait remarquer que la meilleure colonne pour l'étude chromatographique en phase gazeuse des benzodiazépines semble être une colonne de 3 % d'OV_{17} sur gas-chrom Q.

2214 - Spectrophotométrie d'absorption après diazocopulation

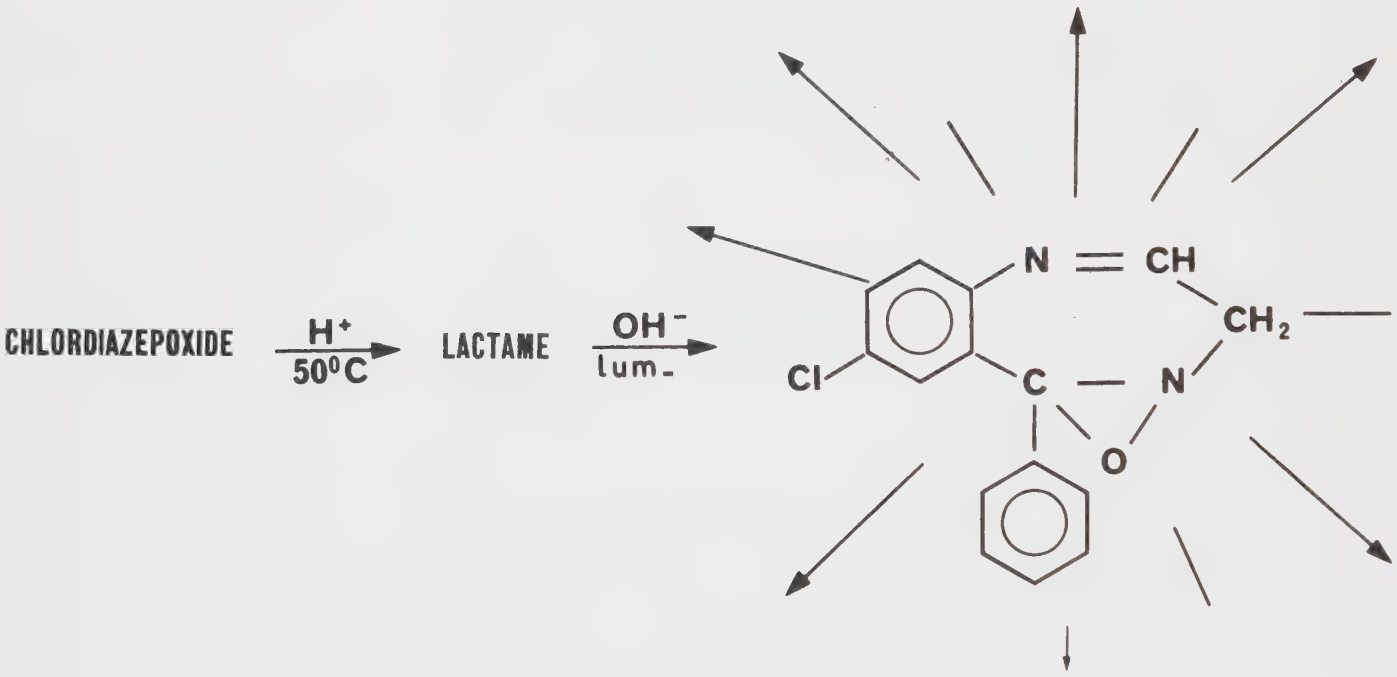
OELSCHLAGER *(53)* le premier, montre qu'il est possible de séparer le nitrazépam des autres benzodiazépines par simple réduction du groupement nitré en position 7, puis diazotation et enfin copulation avec le béta-naphtol.

La copulation avec une amine est également utilisée par TOMPSETT *(78)* pour mettre en évidence dans les urines le dérivé aminé en 7 du nitrazépam; c'est en effet, le seul métabolite capable d'être diazocopule directement sans réduction préalable.

Enfin, FABIANI *(19)* indique qu'il est possible de rechercher directement le chlordiazépoxide dans les urines par simple diazocopulation. Cette constatation, à priori surprenante, peut s'expliquer si on admet, qu'après une prise importante de chlordiazépoxide, on retrouve dans l'urine des quantités non négligeables de lactame ouvert, seul métabolite directement diazocopulable décrit par KOECHLIN *(36)* et SCHWARTZ *(70)*.

2215 - Spectrofluorimétrie

KOECHLIN *(35)* en 1963, a proposé la fluorimétrie pour la recherche du chlordiazépoxide dans les milieux biologiques. En effet, par chauffage en milieu acide faible (glycine - HCl : pH = 4,8), le chlordiazépoxide se transforme en lactame qui, en milieu alcalin, et sous l'influence de la lumière, subit un réarrangement du groupe N-oxyde avec formation d'un composé époxydé fluorescent. Cette technique qui est très sensible, permet par exemple de retrouver du chlordiazépoxide dans le sang, 48 heures après l'absorption orale de 10 à 30 mg de substance.



WALKENSTEIN *(80)* a décrit une méthode de dosage de l'oxazépam en milieu chlorhydrique 3 N, tandis que LAUFFER *(43)* a proposé une technique pour le médazépam.

Le travail le plus intéressant et le plus important a été réalisé en 1968 par BRAUN et ses collaborateurs *(11)*.
Ces auteurs, étudiant la fluorescence de solutions éthanoliques :

- de chlordiazépoxide et de diazépam dans l'acide sulfurique,
- d'oxazépam dans l'acide phosphorique,
- de nitrazépam dans l'acide perchlorique,

ont prouvé qu'il est possible de doser, par fluorimétrie, l'oxazépam avec une sensibilité dont la limite s'établit à 0,005 mcg/ml et les trois autres dérivés avec une sensibilité de l'ordre de 0,1 mcg/ml.

2216 - Méthodes diverses

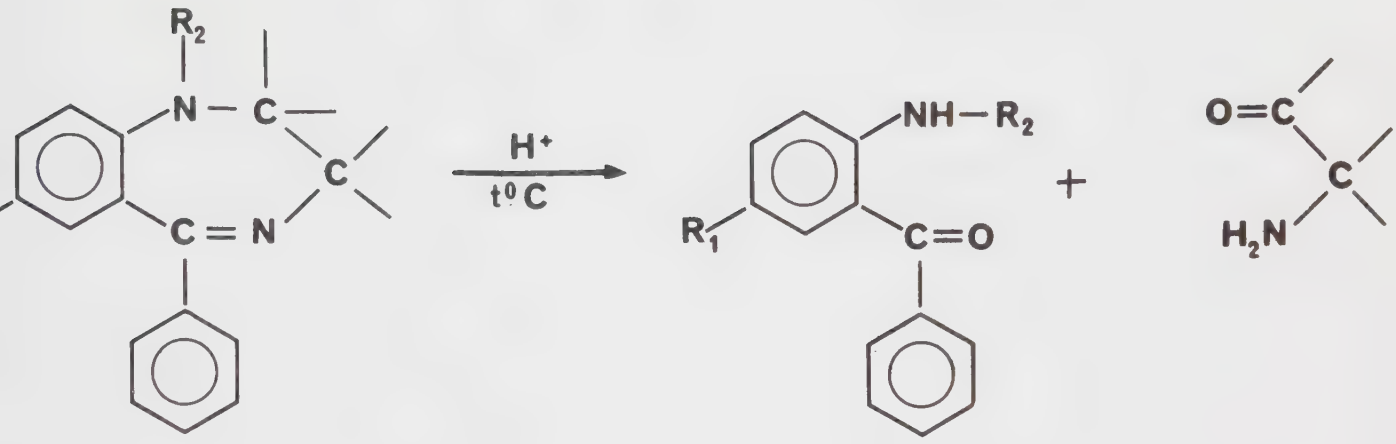
La polarographie a été proposée pour la détermination du diazépam *(52)*, du chlordiazépoxide, du diazépam et du nitrazépam *(51)*, du nitrazépam *(53)*, du médazépam *(50)*, enfin de l'ensemble des benzodiazépines *(12)*.

SALIM *(65)* propose une méthode de dosage potentiométrique de l'oxazépam en milieu non aqueux, le chlordiazépoxide, pouvant être évalué quantitativement par le même procédé *(62)*.

Enfin, la résonance magnétique nucléaire (R.M.N.) *(10, 66)* et la spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge ont été utilisées pour l'identification du chlordiazépoxide *(56)*, du clorazépate *(67)*, du diazépam *(1)*, de l'oxazépam *(21)*, du tétrazépam *(66)*, du chlordiazépoxide, du diazépam, de l'oxazépam et du nitrazépam *(8)*.

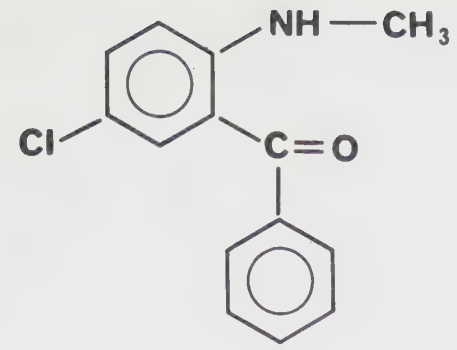
222 - *Produits obtenus par hydrolyse acide*

Comme nous le verrons plus en détail au chapitre 321, l'hydrolyse acide et à température élevée, des dérivés de la phényl-5 benzo-(f), diazépine -1,4, conduit à la formation de benzophénones par rupture du cycle heptagonal selon la réaction générale suivante.



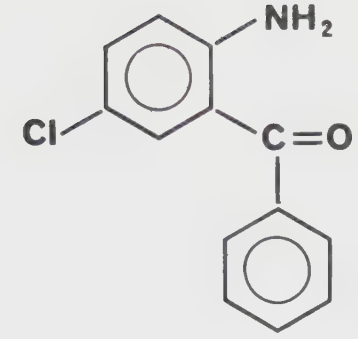
Le Tableau XI rassemble les structures et l'origine des quatre cétones (C) déjà décrites.

Les composés, obtenus par hydrolyse acide des benzodiazépines-1,4 et de leurs métabolites, peuvent être étudiés par diverses méthodes et ont fait l'objet de quelques travaux qui vont être brièvement rappelés.



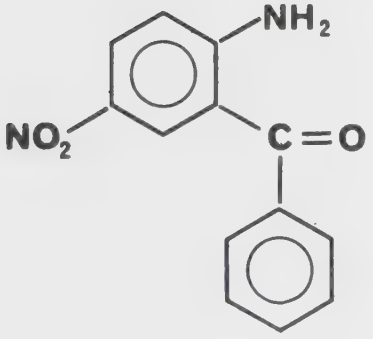
C_1

- diazépam (P)
- 3-hydroxy diazépam (M)
- oxo-2 médazépam (M)



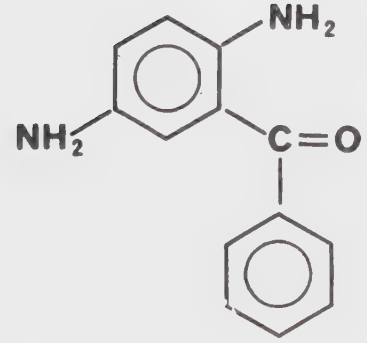
C_2

- chlordiazépoxide (P)
- oxazépam (P)
- N-déméthyl diazépam (M)
- 3-hydroxy N-déméthyl diazépam (M)
- clorazépate (P)
- N-déméthyl chlordiazépoxide (M)
- lactame du chlordiazépoxide (M)



C_3

- nitrazépam (P)
- 3-hydroxy nitrazépam (M ?)



C_4

- 3-hydroxy nitrazépam réduit (M)
- nitrazépam réduit (M)
- 7-acétamido nitrazépam (M)
- 3-hydroxy 7-acétamido nitrazépam (M ?)

C_1 = Amino-2 chloro-5 benzophénone
C_2 = Méthylamino-2 chloro-5 benzophénone
C_3 = Amino-2 nitro-5 benzophénone
C_4 = Diamino-2,5 benzophénone

P - Produit de base
M - Métabolite identifié
M ? - Métabolite supposé

TABLEAU XI - *STRUCTURE ET ORIGINE DES CETONES DEJA DECRITES.*

2221 - *Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultra-violet*

Les travaux réalisés antérieurement sont résumés dans le tableau suivant :

ANNEE	AUTEUR	REFERENCE	MILIEUX	PRODUITS ETUDIES
1964	JOMMI	*26*	Méthanol	C_1 et C_2
1964	PRIBILLA	*56*	Ether. Isopropanol. Ethanol. Chloroforme.	C_2 et acétylamino-2 chloro-5 benzophénone
1965	PRIBILLA	*57*	Ether. Isopropanol. Méthanol.	C_3
1967	BELLOMONTE	*6*	Chloroforme.	C_1 et C_2
1968	TOMPSETT	*78*	NaOH N. NCl N	C_1 C_2 C_3 C_4
1969	ARIZAN	*1*	H_2SO_4 dans l'éthanol.	C_2

2222 - *Chromatographie sur couche mince d'adsorbant*

Dès 1961, BAUMLER *(5)* propose d'identifier l'amino-2 chloro-5 benzophénone, obtenue par hydrolyse acide du chlordiazépoxide, sur gel de silice (benzène) ou (méthanol - acétone - triéthanolamine : 1/1/0,03).

Depuis, d'autres travaux ont été réalisés et sont résumés dans le tableau XII.

ANNEE	AUTEUR	REFE-RENCE	ADSORBANT	MELANGES SOLVANTS	PRODUITS ETUDIES
1964	JOMMI	*26*	Gel de silice	Benzène – acétate d'éthyle (5/1)	C_1 C_2 C_3 C_4
1964	PRIBILLA	*56*	Gel de silice	30 mélanges solvants différents	C_2
1965	PRIBILLA	*57*	Gel de silice	Benzène. Méthanol Benzène – Méthanol (9,9/0,1) Chloroforme – Acétone (9/1) Méthanol – acétone – triéthanolamine (1/1/0,3)	C_3
1967	HERMANS	*25*	Gel de silice	Chloroforme – éther (3/1) Acétate d'éthyle – n-hexane – ammoniaque à 12% (60/27/25)	C_1 C_2 C_3 C_4
1968	DURISINOVA	*17*	Kielselgel D; Polyamid	5 mélanges solvants différents	hydroxy-2 benzophénones
1968	TOMPSETT	*78*	Gel de silice	n-heptane-chloroforme-éthanol (20/20/1)	C_2
1969	KAMM	*28, 29*	Gel de silice	n-heptane-chloroforme-éthanol (10/10/1)	C_1 C_2
1969	ARIZAN	*1*	Gel de silice	chloroforme – toluène – méthanol (10/4/1)	C_2

TABLEAU XII : *NATURE DE L'ADSORBANT ET COMPOSITION DES MELANGES DE MIGRATION POUR L'IDENTIFICATION CHROMATOGRAPHIQUE SUR COUCHE MINCE DES PRODUITS D'HYDROLYSE DES BENZODIAZEPINES ET DE LEURS METABOLITES.*

2223 - Chromatographie en phase gazeuse

Peu de travaux ont été jusqu'alors consacrés à l'identification par C.P.G. des produits d'hydrolyse des benzodiazépines-1,4.

SILVA et ses collaborateurs *(75)* proposent d'identifier C_1 et C_2, provenant de l'hydrolyse du diazépam et de son métabolite N-déméthylé, sur colonne de gas-chrom P silanisé recouvert de 2 % de carbowax 20 M à la température de 195° C. Plus tard, les mêmes auteurs *(73)* conseillent l'utilisation d'une colonne légèrement différente (2 % de carbowax 20 M - acide téréphtalique sur gas-chrom P silanisé).

En 1967, CANO *(13, 14)* propose une méthode de "détermination du diazépam dans le sang et l'urine par chromatographie en phase gazeuse" dans des conditions voisines de celles proposées par SILVA.

Récemment, VIALA *(79)* a montré, par chromatographie sur colonne à 2 % de carbowax 20 M sur gas-chrom Z (température de la colonne : 195° C), des deux benzophénones formées par hydrolyse acide du diazépam et de son dérivé N-déméthylé (C_1 et C_2), que celui-ci n'apparaît dans le sang qu'au bout de 5 à 6 heures et s'y maintient plus d'une semaine après absorption de diazépam, sous forme de sirop ou de gouttes, par des jeunes enfants (0,36 mg/kg).

2224 - Spectrophotométrie d'absorption après diazocopulation

Si les benzodiazépines-1,4 ne conduisent pas directement (sous l'influence de réactifs) à la

formation de colorations pouvant être utilisées sur le plan analytique, il est évident que, dès que la structure du composé obtenu par hydrolyse acide du chlordiazépoxide a été connue (amine aromatique primaire), la diazocopulation fut proposée pour l'identifier et éventuellement le doser.

C'est ainsi que BAULMER *(5)* utilise après diazotation, la copulation avec le béta-naphtol, ce qui conduit à un azoïque intensément coloré en rouge.

D'autres auteurs *(1, 9, 24, 29, 35, 56, 57, 58)* préfèrent utiliser l'amine préconisée par BRATTON et MARSHALL (chlorhydrate d'alpha-naphtyl-éthylène diamine).

Cette réaction très sensible, permet en outre de mettre en évidence l'amino-2 nitro-5 benzophénone et la diamino-2,5 benzophénone *(9, 25, 78)*.

Bien entendu, une telle réaction ne peut être utilisée qu'après avoir séparé les composés formés des nombreuses autres molécules, notamment médicamenteuses, possédant également une fonction amine aromatique primaire.

2225 - Méthodes diverses

Signalons enfin, outre la possibilité de détermination bromatométrique des benzophénones *(30)*, l'utilisation éventuelle des spectres d'absorption dans l'infra-rouge *(6, 56, 57, 78)* pour aider à l'identification de ces composés, après l'hydrolyse chlorhydrique des produits dont ils dérivent.

23 - *ETUDE QUANTITATIVE*

231 - *Chromatographie en phase gazeuse*

La chromatographie en phase gazeuse est la technique analytique la plus souvent mise en oeuvre, pour l'évaluation quantitative des dérivés de la benzo-(f)-diazépine-1,4.

A l'exception de MARCUCCI, les auteurs se sont attachés exclusivement à la détermination du diazépam (ou de son métabolite N-déméthylé) dans les milieux biologiques et se réfèrent à une gamme d'étalonnage.

C'est ainsi que CANO *(13, 14)*, FOSTER *(22)*, SILVA *(73)* et VIALA *(79)* dosent le diazépam et son principal métabolite dans le sérum et les urines.

Seul FOSTER, après une extraction par le chloroforme à pH 7, détermine le temps de rétention absolu et la hauteur du pic correspondants à la benzodiazépine proprement dite. Les autres auteurs hydrolysent préalablement le diazépam et, après extraction de la benzophénone correspondante, réalisent la détermination quantitative.

Le travail le plus important et le plus intéressant est rapporté par MARCUCCI et ses collaborateurs *(46)*. En plus de l'étude du comportement chromatographique en phase gazeuse de cinq composés (le diazépam, ses deux métabolites, l'oxazépam et le nitrazépam), l'intérêt de ce travail est dû à l'utilisation d'un étalon interne : la 2 N- benzylamino-5 chloro benzophénone. En effet, cette élégante façon de procéder évite, comme nous l'avons déjà souligné *(41)*, de réaliser un étalonnage avant chaque série d'analyses et ce, afin de pallier aux variations des paramètres de cette technique analytique; notamment, la modification des débits gazeux, la variation de température et surtout le "vieillissement" de la colonne.

232 - *Spectrofluorimétrie*

KOECHLIN *(35)*, le premier, après extraction du chlordiazépoxide, transforme celui-ci en lactame, sur lequel est réalisé un dosage fluorimétrique. Si, peu de temps après, WALKENSTEIN *(80)* décrit également une technique de détermination quantitative de l'oxazépam en milieu HCl 3 N, le principal travail est dû à BRAUN et ses collaborateurs *(11)*. Comme nous le rapportons au chapitre 2215, les auteurs ont étudié la fluorescence de solutions alcooliques de chlordiazépoxide, de diazépam, d'oxazépam et de nitrazépam dans divers milieux acides. L'étude ayant été réalisée sur des solutions pures de benzodiazépines, les auteurs signalent qu'ils tentent d'appliquer la méthode au dosage des composés et de leurs métabolites dans les milieux biologiques. Si la méthode est simple et précise, CAILLE *(12)* fait cependant remarquer, que la détermination quantitative des dérivés de la benzodiazépine-1,4 n'est possible, que si ces composés ne sont pas associés à d'autres molécules médicamenteuses.

233 - *Spectrophotométrie d'absorption après diazocopulation*

Comme nous l'avons brièvement signalé au début du chapitre 222, l'hydrolyse chlorhydrique à chaud du chlordiazépoxide, du clorazépate, du nitrazépam et de l'oxazépam, conduit à la formation d'une amine aromatique primaire. Aussi, dès 1961, cette propriété fut mise à profit par BAUMLER *(5)* et RANDALL *(58)*, pour la mise en évidence du chlordiazépoxide, après hydrolyse et diazocopulation de la benzophénone obtenue.

Outre l'identification, il est également possible de pratiquer une évaluation quantitative des composés précédemment cités *(5, 24, 29, 56, 58, 60, 62, 80)*.

234 - *Méthodes diverses*

L'analyse polarographique fut préconisée par de nombreux auteurs *(1, 12, 50, 51, 52, 53)*, mais FAZZARI *(20)*, tout en décrivant une méthode de dosage de l'oxazépam, fait toutefois remarquer que, si la méthode est rapide, la spécificité n'est que "raisonnable" et la sensibilité faible (10 mcg).

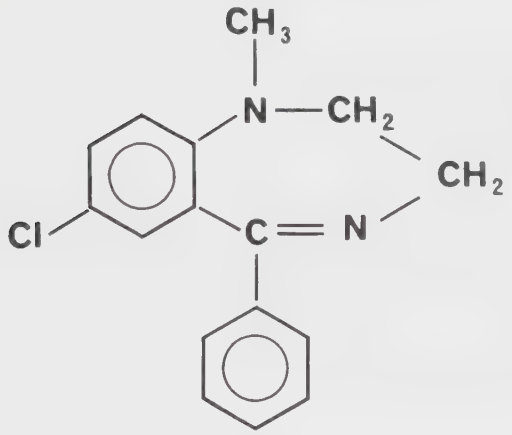
SALIM *(65)* propose une détermination potentiométrique de l'oxazépam; le chlordiazépoxide pouvant être évalué quantitativement par le même procédé *(62)*.

Enfin, SILVA *(73)* utilise la spectrophotométrie ultra-violette pour le dosage du diazépam et de son métabolite N-déméthylé. Cependant, cette méthode, comme le souligne d'ailleurs KOECHLIN *(34)*, malgré sa commodité d'application, ne permet pas d'évaluer avec précision les concentrations en diazépam inférieures à 1 mcg/ml de sang.

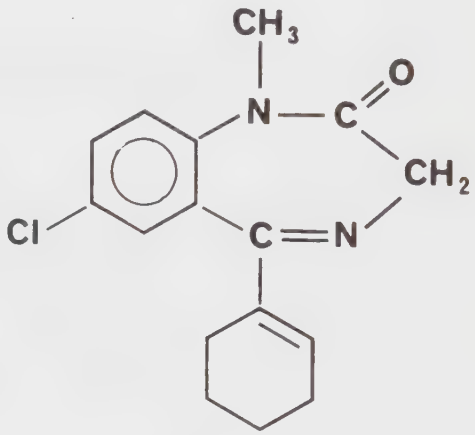
III - PARTIE EXPERIMENTALE

31 - *BUT DU TRAVAIL*

L'introduction récente en thérapeutique de deux nouveaux dérivés de la benzo-(f)-diazépine-1,4, le médazépam et le tétrazépam nous a conduit à entreprendre une étude analytique complète de ces deux dérivés.



MEDAZEPAM



TETRAZEPAM

Pour réaliser cette étude, nous avons d'abord effectué un choix de méthodes analytiques et mis au point des techniques nouvelles; ces dernières ont été appliquées à l'étude du médazépam et du tétrazépam.

L'approche analytique des benzodiazépines-1,4 présente une caractéristique : elle peut être réalisée en s'adressant soit directement à ces composés (ou à leurs métabolites qui présentent du point de vue physico-chimique de grandes analogies avec les mélécules médicamenteuses dont ils dérivent), soit aux produits formés par hydrolyse acide des composés précédents. Aussi, après avoir identifié les composés obtenus par hydrolyse chlorhydrique du médazépam,

du tétrazépam et de leur dérivé N_1 déméthylé, nous avons étudié leur comportement analytique en utilisant les mêmes méthodes que celles proposées pour les deux molécules médicamenteuses.

Nous avons ensuite appliqué ces techniques à l'étude de l'ensemble des benzodiazépines, de leurs principaux métabolites et des produits obtenus par leur hydrolyse chlorhydrique.

Enfin, à la lumière des résultats obtenus, nous avons tenté de mettre au point un protocole opératoire qui puisse être utilisé en Toxicologie, pour la recherche des benzo-(f)-diazépines-1,4 dans les milieux biologiques.

32 - *CHOIX DE TECHNIQUES ANALYTIQUES ET PROTOCOLES OPERATOIRES*

Le choix effectué concerne les méthodes suivantes :

- Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultra-violet;
- Chromatographie sur couche-mince d'adsorbant;
- Chromatographie en phase gazeuse;
- Spectrofluorimétrie;
- Spectrophotométrie d'absorption dans le visible (après diazocopulation).

321 - *Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultra-violet*

3211 - Réactifs

- Méthanol (Carlo Erba 41.4901)
- Solution aqueuse d'acide chlorhydrique 2 N
- Solution aqueuse d'hydroxyde de sodium 0,2 N

3212 - Protocole opératoire

Les spectres d'absorption ont été enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre SPILA type D.M.S., série X Lérès avec enregistreur Minigraph type C.R./020, cuves en quartz de 1 cm.

Toutes les déterminations ont été pratiquées sur des solutions de concentration $2 . 10^{-5}$ M dans le méthanol, l'acide chlorhydrique 2N ou la soude 0,2 N.
Les molécules faisant l'objet de ce travail sont solubles dans le méthanol, mais faiblement solubles dans l'acide chlorhydrique 2N et la soude 0,2 N. C'est pourquoi nous avons préparé des solutions méthanoliques de chaque produit, à la concentration $4 . 10^{-4}$ M, à partir desquelles, par dilution avec l'acide chlorhydrique 2N ou la soude 0,2 N, nous avons préparé les solutions $2 . 10^{-5}$ M. (Les témoins ont été obtenus en diluant au vingtième le méthanol dans les solutions acides ou basiques de normalités identiques à celles retenues pour cette étude).
Les mesures ont été réalisées immédiatement après la préparation des solutions, certaines d'entre elles étant instables.

322 - *Chromatographie sur couche-mince d'adsorbant*

Après plusieurs essais concernant l'adsorbant et la composition du solvant, nous avons obtenu les meilleurs résultats en procédant à l'analyse chromatographique dans les conditions suivantes :

- couche-mince d'oxyde d'aluminium F_{254} type E (Merck n° 5713/0025) ;
- activation des plaques : une heure à 105° C puis refroidissement sous vide en présence d'actigel;
- saturation des enceintes durant 12 heures (parois tapissées de papier Arches 304) ;
- dépôt de 0,02 micromole de chaque composé en solution méthanolique;
- migration du solvant à partir de la ligne de dépôt : 12 cm;
- température de la pièce : 21° C $\pm$ 1° C;
- localisation des spots et mesure des distances de migration par irradiation des plaques (contenant un indicateur de fluorescence) à 254 nm.

- Mélanges solvants :

A - Benzodiazépines et métabolites

- produit de référence pour la mesure des Rf relatifs : diazépam;

mélange solvant { chloroforme (Merck n° 2445) ... 29
éthanol (Merck n° 972) ... 1

B - Produits d'hydrolyse

- produit de référence pour la mesure des Rf relatifs : benzophénone;

- mélange solvant { benzène (Merck n° 1783) ... 3
chloroforme (Merck n° 2445) ... 1

323 - *Chromatographie en phase gazeuse*

Nous avons obtenu les meilleurs résultats, après de nombreux essais, avec une colonne de 3 % d'OV17 (méthyl-phényl-silicone) sur Gas Chrom Q 100/120 mesh en opérant dans les conditions suivantes :

- appareil : chromatographe VARIAN AEROGRAPH modèle 1200;
- gaz vecteur : Azote "U" (Air liquide);
- débit gaz vecteur : 25 ml/minute;
- pression d'entrée du gaz vecteur : 3 bars;
- détecteur à ionisation de flamme d'hydrogène;
- débit d'hydrogène : 25 ml/minute;
- longueur de la colonne (acier) : 2 mètres;
- diamètre de la colonne : 1/8 pouce;
- température de l'injecteur : 290° C;
- température du détecteur : 290° C;
- température de la colonne :
  benzodiazépines et métabolites... : 250° C
  produits d'hydrolyse ..... : 210° C
- vitesse de déroulement du papier de l'enregistreur :
  10 pouces/heure.

3231 - Etude qualitative

Dans les conditions d'expérience précisées ci-dessus nous avons déterminé :

1°) les distances et temps de rétention absolus (DR et TR) de chacun des produits;

2°) les distances et temps de rétention relatifs (D'R et T'R) par rapport à une substance de référence :
- diazépam pour les benzodiazépines et les métabolites;
- oxazépam pour les produits d'hydrolyse.

3232 - Etude quantitative

Cette étude a été réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites pour la détermination qualitative.
La méthode utilisée est celle de l'étalonnage interne. En effet, cette façon de procéder évite de réaliser un étalonnage, toujours fastidieux, avant chaque série d'analyses et permet de palier aux erreurs inhérentes à la technique analytique utilisée : modification des débits gazeux, variation de la température et surtout "vieillissement" de la colonne.
Afin de pouvoir appliquer la relation fondamentale

$$m_X = m_E \cdot K'_X \cdot \frac{S_X}{S_E}$$

m_X = quantité de produit à doser
m_E = quantité de substance étalon
S_X = aire du pic de la substance à doser
S_E = aire du pic de la substance étalon
K'_X = coefficient de proportionnalité relatif

Nous avons :

a) calculé les coefficients de proportionnalité relatifs (K'_X) de chaque composé.

b) mis en évidence l'invariabilité du K'_X de chaque composé (pour trois concentrations différentes).

324 - *Spectrofluorimétrie*

3241 - Réactifs

Ethanol (Carlo Erba R.P. A.C.S.)
Acide perchlorique à 70 % (d = 1,67) (Carlo Erba R.P. A.C.S.)
Acide phosphorique (d = 1,70) (Carlo Erba R.P. A.C.S.)
Acide sulfurique (d = 1,84) (Carlo Erba R.S.).

3242 - Protocole opératoire

Les spectres de fluorescence ont été enregistrés à l'aide d'un spectrofluorimètre JOBIN YVON type BEARN avec enregistreur GRAPHIRAC II type BG, cuves en quartz de 1 cm.

C'est en solution alcoolique et en milieu acide (acide de nature variable selon le composé étudié) que les benzodiazépines présentent la fluorescence la plus intense. Pour chaque produit étudié, nous avons d'abord déterminé le milieu acide dans lequel la fluorescence de la solution éthanolique est la plus intense, puis nous avons procédé à l'enregistrement des spectres d'excitation et d'émission (concentration finale de chaque composé : $1 . 10^{-5}$ M) en ajoutant à 2 ml de solution éthanolique de chaque composé, 8 ml d'acide perchlorique ou phosphorique ou sulfurique.

325 - *Spectrophotométrie d'absorption dans le visible après diazocopulation*

L'étude métabolique des benzodiazépines, rappelée au *chapitre 13*, et l'étude de la structure chimique des composés obtenus par hydrolyse chlorhydrique de certains métabolites (*tableau XI*), nous montrent que parmi les molécules décrites, certaines possèdent une fonction amine aromatique primaire. Aussi nous avons pratiqué des réactions de diazocopulation dans les conditions opératoires suivantes.

3251 - Réactifs

- Solution aqueuse extemporanée de nitrite de sodium à 0,5 %;
- Solution aqueuse d'acide chlorhydrique 4 N;
- Solution aqueuse de sulfamate d'ammonium à 2 %;
- Réactif de TREFOUEL : solution aqueuse de chlorhydrate de N-alpha-naphtyl N', N' diéthylpropylènediamine à 0,1 %.

3252 - Protocole opératoire

A 1 ml de solution aqueuse de chacun des produits (solution de concentration $4 . 10^{-5}$ M obtenue par dilution au dixième dans l'eau distillée de solutions méthanoliques $4 . 10^{-4}$ M), on ajoute 1 ml d'acide chlorhydrique 4,0 N et 0,5 ml de solution aqueuse de nitrite de sodium. Après agitation rapide, le tube est placé à 0°C durant cinq minutes, puis ramené à la température du laboratoire. 0,5 ml de solution aqueuse de sulfamate d'ammonium est additionné au milieu. Après agitation durant une minute, on ajoute de nouveau 0,5 ml de cette solution et une nouvelle agitation de une minute est pratiquée.

Après addition de 1 ml de réactif de TREFOUEL, la solution est portée à 50° C durant 15 minutes puis refroidie sous un courant d'eau froide. La densité optique est mesurée à la longueur d'onde du maximum d'absorption de la coloration contre un témoin réactif.

33 - *ETUDE ANALYTIQUE DU TETRAZEPAM*

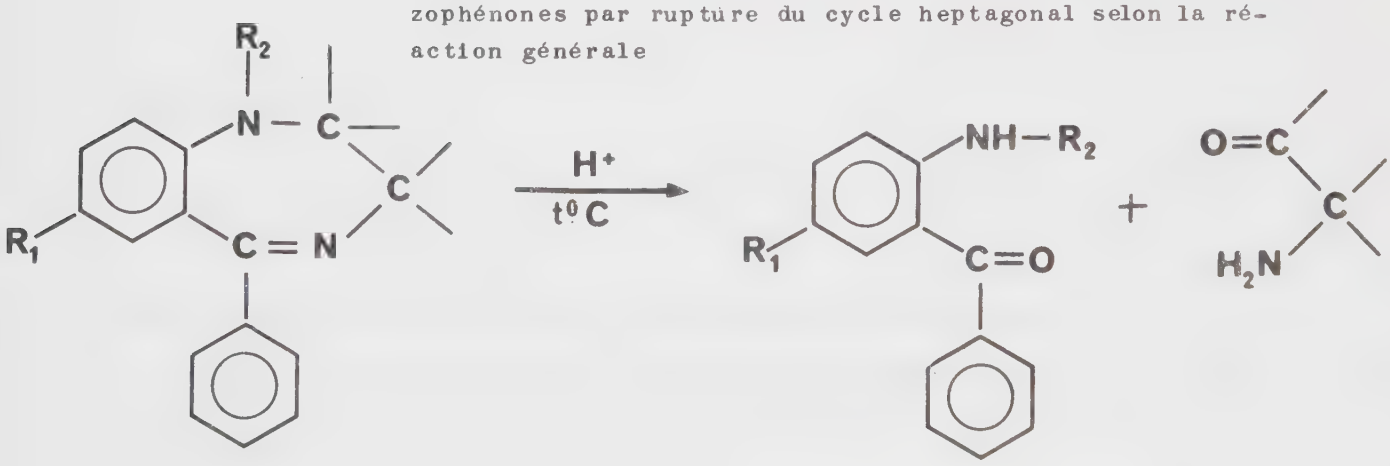
331 - *Etude analytique du tétrazépam et de son dérivé N_1-déméthylé*

Compte tenu de l'analogie de structure entre le tétrazépam et le diazépam, il semble logique d'envisager pour le tétrazépam un métabolisme voisin de celui décrit pour le diazépam avec obtention, notamment, d'un dérivé N_1-déméthylé. C'est la raison pour laquelle nous avons également procédé à l'étude analytique de ce métabolite jusqu'alors non isolé.
Les résultats du comportement analytique de ces deux molécules dans les conditions précisées antérieurement sont rassemblés dans le *Tableau XIII*.

332 - Etude analytique des composés obtenus par hydrolyse chlorhydrique du tétrazépam et de son dérivé N_1-déméthylé

3321 - Rappel concernant les composés obtenus par hydrolyse des dérivés de la phényl-5 benzo-(f)-diazépine-1,4.

Comme nous l'avons rappelé au *chapitre 222*, l'hydrolyse acide et à température élevée des dérivés de la phényl-5 benzo-(f)-diazépine-1,4 conduit à la formation de benzophénones par rupture du cycle heptagonal selon la réaction générale



La structure et l'origine des quatre cétones, antérieurement décrites par d'autres auteurs, sont résumées dans le *Tableau XI (cf chapitre 222)*.

SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION DANS L'ULTRA-VIOLET

1) Solutions méthanoliques	λ max. (en nm)	λ min.
Tétrazépam	229, 310	295
Tétrazépam N_1-déméthylé	227, 312	295
2) Solutions dans l'acide chlorhydrique 2N		
Tétrazépam	211, 242, 287, 350	220, 267, 324
Tétrazépam N_1-déméthylé	211, 239, 286, 350	217, 264, 325
3) Solutions dans la soude 0,2 N		
Tétrazépam	230	217
Tétrazépam N_1-déméthylé	232, 331	210, 307

CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE D'ADSORBANT

	Rf absolu	Rf relatif
Diazépam (subst. référence)	0,80	/
Tétrazépam	0,81	1,01
Tétrazépam N_1-déméthylé	0,40	0,50

CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (250° C)

	DR (cm)	TR (mn et 1/100)	D'R = T'R	K'X
Diazépam (subst. référence)	4,60	10,87	/	1
Tétrazépam	4,15	9,81	0,90	1,21
Tétrazépam N_1-déméthylé	5,7	13,45	1,24	1,23

SPECTROFLUORIMETRIE

	Milieu acide	λ max. (en nm) excitation	λ max. émission
Tétrazépam	H_3PO_4	398 nm	492 nm
Tétrazépam N_1-déméthylé	H_3PO_4	397 nm	486 nm

SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION DANS LE VISIBLE APRES DIAZOCOPULATION

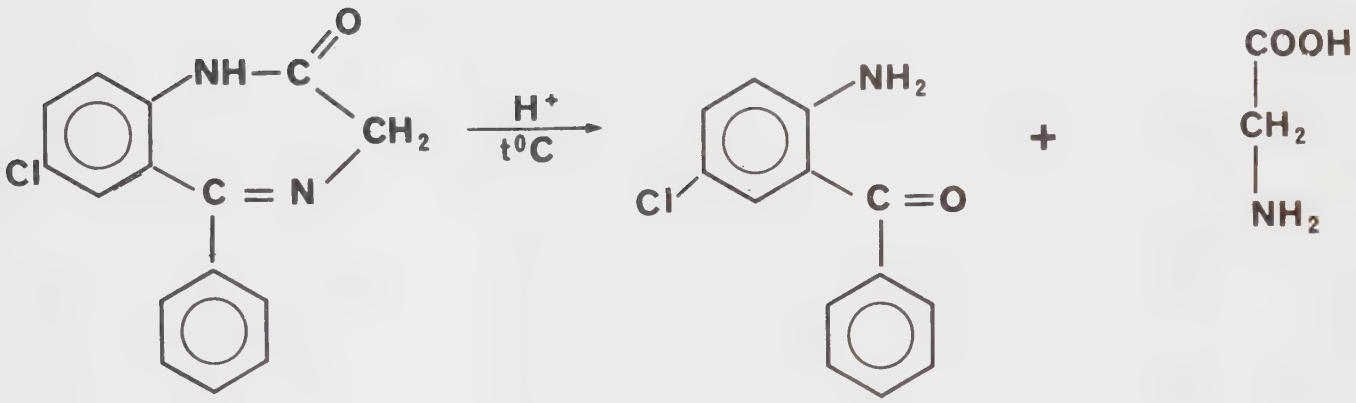
Aucune coloration n'est obtenue en employant le protocole opératoire antérieurement décrit ce qui est en accord avec la structure chimique des deux molécules étudiées.

TABLEAU XIII : ETUDE ANALYTIQUE DU TETRAZEPAM ET DU TETRAZEPAM N_1-DEMETHYLE.

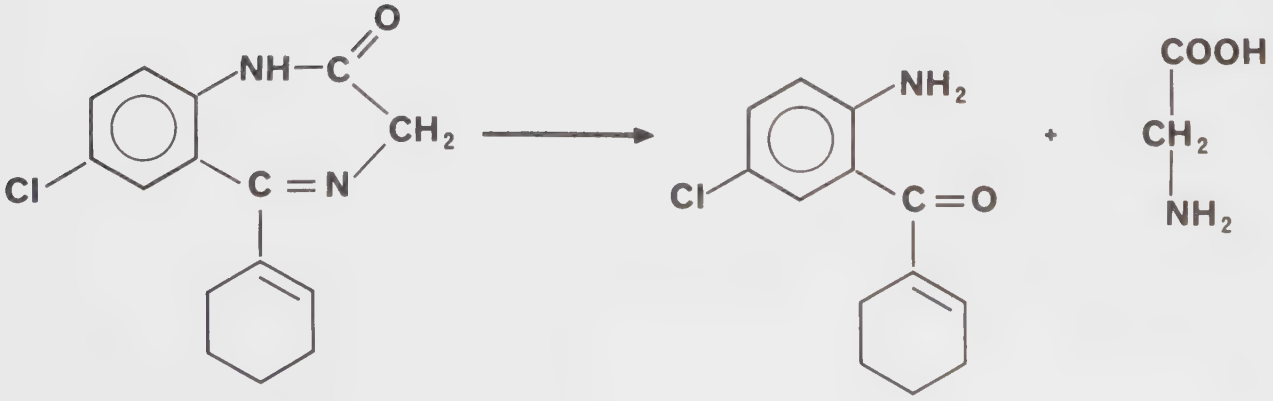
3322 - Composé obtenu par hydrolyse chlorhydrique du tétrazépam N_1-déméthylé

33221 - Hypothèse concernant la nature du composé formé

L'hydrolyse chlorhydrique (HCl 4N) pendant 30 minutes au bain-marie bouillant du diazépam N_1-déméthylé conduit à la formation d'amino-2 chloro-5 benzophénone.



Compte tenu de l'analogie de structure entre le tétrazépam N_1-déméthylé et le diazépam N_1-déméthylé, l'application au tétrazépam N_1-déméthylé de la technique d'hydrolyse précédemment décrite devrait conduire à l'obtention d'amino-2 chloro-5 : benzoylcyclohéxène-1'yl suivant la réaction



33222 - **Conditions opératoires**

L'hydrolyse du tétrazépam N_1-déméthylé a été réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites pour le diazépam N_1-déméthylé.
En vue de l'extraction, par un solvant organique, de la cétone théoriquement formée, la solution acide a été refroidie dans un bain d'eau glacée. A la différence de ce qui est observé lors de l'hydrolyse (dans les mêmes conditions) du diazépam N_1-déméthylé, un précipité apparaît au cours du refroidissement.
Ce précipité, jaune, a été isolé par filtration, lavé à l'eau chlorhydrique puis séché sous vide.
La solution acide filtrée a été conservée.
Après dissolution dans le méthanol du composé isolé, l'analyse par chromatographie en phase gazeuse montre qu'il ne s'agit pas de tétrazépam N_1-déméthylé non hydrolysé. Une réaction de diazocopulation pratiquée sur ce produit est négative. Bien qu'inattendu, ce résultat exclut la présence d'une fonction amine aromatique primaire dans la structure du composé isolé.
Le filtrat acide précédent a été soumis à une extraction par l'éther éthylique dépéroxydé, directement et après alcalinisation par du carbonate acide de sodium. Dans les deux cas, l'étude par chromatographie en phase gazeuse nous a montré la présence de deux composés, dont l'un, le plus important, possède les mêmes caractéristiques que le produit isolé par filtration. Une réaction de diazocopulation pratiquée sur une partie aliquote du filtrat acide conduit à une réaction légèrement positive, ce qui traduit la présence d'un composé possédant une fonction amine aromatique primaire et auquel, vraisemblablement, correspond le second composé identifié par C.P.G.

Avant de procéder à l'identification du composé isolé par filtration, nous avons entrepris une étude des conditions d'hydrolyse.
Quantitativement nous avons obtenu les meilleurs résultats dans les conditions suivantes :
- normalité de l'acide chlorhydrique - N
- temps d'hydrolyse - 40 minutes
- température du bain-marie - 100° C
- concentration initiale - 1 mg/ml.

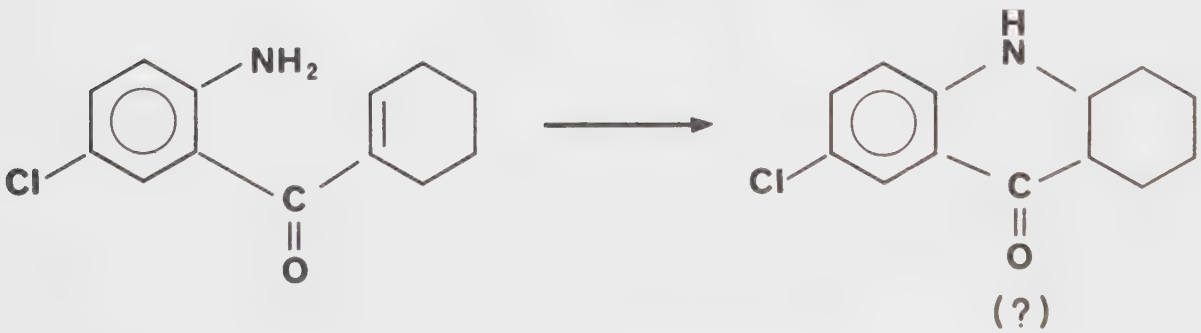
33223 - Identification et structure du composé obtenu.

Nos premières observations conduisent aux données suivantes :

a) le composé obtenu par hydrolyse chlorhydrique du tétrazépam N_1-déméthylé n'est pas diazocopulable;

b) dans la solution acide filtrée existe, en très petite quantité, une substance possédant une fonction amine aromatique primaire.

Nous avons alors envisagé une cyclisation intramoléculaire de l'amino-2 chloro-5 benzoylcyclohéxène-1'yl, composé intermédiaire non isolé, qui conduirait à la formation d'un composé tricyclique dérivé de l'acridone *(39)*.



Nous avons pratiqué l'identification du composé isolé par filtration, après l'avoir purifié dans les conditions suivantes.

Le composé, dissous dans un volume minimum de benzène, est fixé à la partie supérieure d'une colonne de florisil puis élué par du benzène. La solution benzénique recueillie à la partie inférieure de la colonne est évaporée. Le résidu d'évaporation, de couleur jaune pâle, est ensuite placé dans un excitateur puis soumis à l'identification.

Les résultats analytiques sont les suivants :

1°) Formule brute : C_{13} H_{14} N O Cl

	C	H	N	Cl
Calculé	66,24	5,98	5,94	15,05
Trouvé	65,95	5,95	5,91	14,60

2°) Spectre de masse :

Il a été enregistré sur appareil A.E.I. M-S9 à l'I.C.S.N. (Gif-sur-Yvette) par le Docteur B.C. DAS.

On observe deux pics; l'un correspond à un composé de masse 235 (^{35}Cl), l'autre à un composé de masse 237 (^{37}Cl). La masse théorique du composé envisagé est 235,5.

3°) Spectre de résonance magnétique nucléaire.

Il a été enregistré sur appareil VARIAN T-60 60 MHz à l'I.C.S.N. dans les conditions suivantes :

Solvant : $CDCl_3$

S = 0 sur T M S.

L'exploitation du spectre obtenu montre la présence :

- **d'un proton situé à 4,3 ppm, caractéristique d'un groupement - NH -**
- **d'un proton (H-C_{4a}) situé à 3,25 ppm, placé en α d'un groupement - NH -**
- **d'un proton (H-C_{9a}) situé à 2,25 ppm, placé en α d'un groupement - CO -**
- **de huit protons cyclohéxaniques (1 à 2 ppm).**

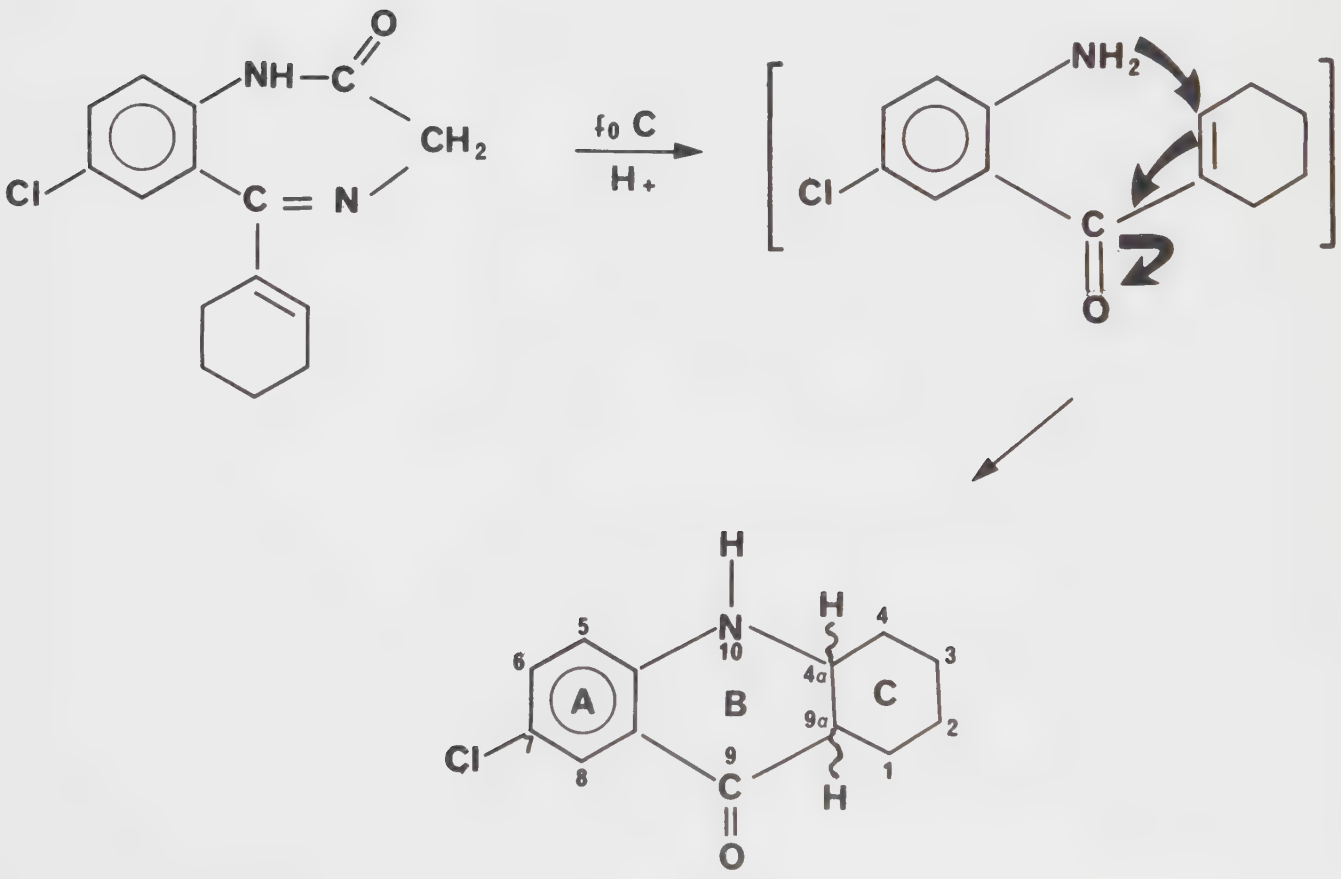
4°) Spectre infra-rouge.

Enregistré en pastille de bromure de potassium, il met en évidence :

- une fonction carbonyle (1.650 cm^{-1})
- une fonction amine secondaire (3.350 cm^{-1}).

Les résultats de l'étude analytique sont en parfait accord avec l'hypothèse émise précédemment.

L'hydrolyse chlorhydrique à chaud du tétrazépam N_1-déméthylé conduit donc à l'obtention de chloro-7 hexahydro-1,2,3,4,4a,9a acridone par cyclisation intramoléculaire de l'amino-2 chloro-5 benzoyl-cyclohexène-1'yl, composé intermédiaire non isolé. Le mécanisme de la réaction semble être le suivant:



3323 - Composé obtenu par hydrolyse chlorhydrique du tétrazépam

33231 - **Conditions opératoires**

Le tétrazépam a été étudié dans les mêmes conditions que son dérivé N_1-déméthylé. Après hydrolyse et refroidissement de la solution chlorhydrique, on pratique une extraction par l'hexane.

L'évaporation des extraits héxaniques conduit à un composé jaune qui est ensuite cristallisé dans le méthanol. Ce composé se comporte en chromatographie en phase gazeuse comme un mélange de deux produits (A et B).

Dans le cas du tétrazépam, l'acidité de la solution chlorhydrique doit être précisée.

En effet, si lors de l'hydrolyse du dérivé N_1-déméthylé du tétrazépam nous avons toujours obtenu, quelle que soit la normalité en acide chlorhydrique (0,5 à 8 N) de la chloro-7 hexahydro-1,2,3,4,4a,9a acridone (plus une quantité négligeable d'une substance diazocopulable qui reste en solution acide), nous avons constaté, lors de l'hydrolyse du tétrazépam, que les résultats obtenus varient avec la normalité de la solution chlorhydrique.

L'expérience a été conduite dans les conditions suivantes :

- temps d'hydrolyse, température du bain-marie et concentration identiques à ceux mentionnés ci-dessus;
- normalité de l'acide variant de 0,5 N à 6 N;
- étude des composés formés par C.P.G.

Les résultats obtenus sont rassemblés sur la *Figure I*.

Etude par C.P.G. des composés formés par hydrolyse chlorhydrique du Tétrazépam.

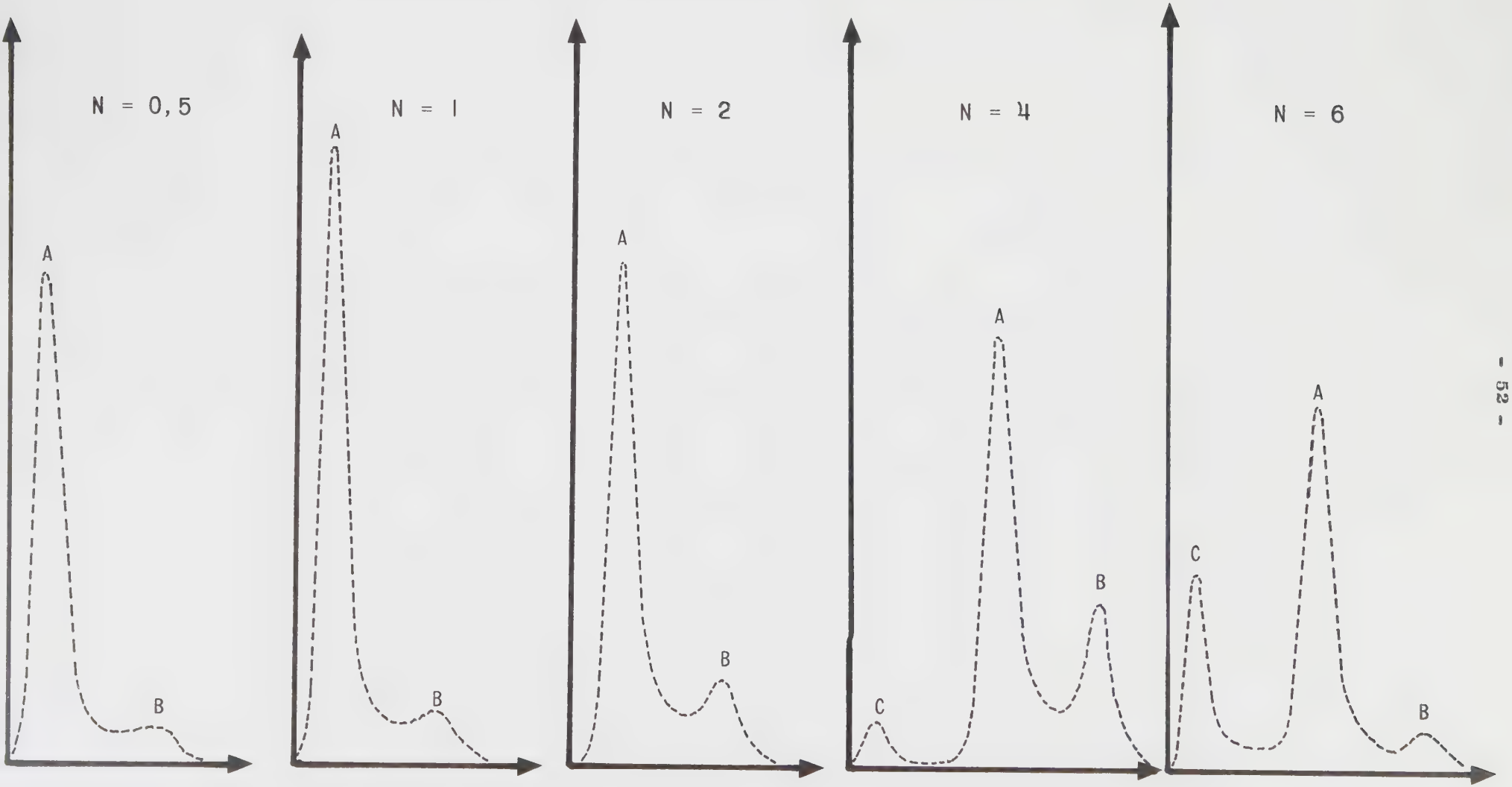


FIGURE : I *Influence de la normalité de la solution chlorhydrique.*

On constate :

que le rendement le plus important quant à la formation du produit principal d'hydrolyse (A) est obtenu pour une normalité qui correspond à l'acide chlorhydrique N;

que lorsque la normalité croît, un composé secondaire (B) se forme aux dépens de A.

que pour des normalités supérieures à 4N, apparaît un troisième composé (C), que nous n'avons pas isolé à l'état suffisamment pur pour le soumettre à l'analyse en vue d'une identification.

33232 **Identification et structure du composé obtenu.**

Le composé A obtenu par hydrolyse chlorhydrique N du tétrazépam et quantitativement le plus important, a été purifié dans les conditions suivantes.

Après refroidissement, la solution chlorhydrique est extraite par l'hexane. L'extrait hexanique est évaporé sous vide. Le résidu jaune est dissous dans le minimum d'hexane et fixé à la partie supérieure d'une colonne de florisil. Le composé est élué par du benzène. La solution benzénique recueillie à la partie inférieure de la colonne est évaporée. Le résidu jaune pale est ensuite placé dans un dessicateur. L'étude chromatographique en phase gazeuse montre que le produit n'est pas pur mais renferme des traces du composé B (1 à 3 %).

Nous avons tenté d'éliminer B par cristallisation et par chromatographie sur colonne mais sans résultat satisfaisant.

Le composé A que nous avons soumis à l'identification contenait 1,5 % du produit B.

Les résultats de l'étude analytique concernant le produit A sont les suivants :

1°) Formule brute $C_{14}\ H_{16}\ N\ O\ Cl$

	C	H	N	Cl
calculé	67,33	6,46	5,61	14,20
trouvé	67,02	6,51	5,76	14,24

2°) Spectre de masse :
On observe deux pics; l'un correspond à un composé de masse 249 (^{35}Cl), l'autre à un composé de masse 251 (^{37}Cl).

3°) Spectre de résonance magnétique nucléaire :
Solvant : $CDCl_3$
δ = 0 sur TMS

L'exploitation du spectre obtenu montre la présence :
- **d'un radical méthyl situé à 2,90 ppm, caractéristique d'un groupement: N-CH_3**
- **d'un proton (H-C_{4a}) situé à 3,40 ppm, placé en α d'un groupement = N - CH_3**
- **d'un proton (H-C_{9a}) situé à 2,50 ppm, placé en α d'un groupement -CO-**
- **de huit protons cyclohexaniques situés entre 1 et 2 ppm.**

4°) Spectre infra-rouge :
Il met en évidence
- une fonction carbonyle (1,670 cm^{-1})
- une fonction amine tertiaire (2.980 cm^{-1}).

Les résultats ci-dessus montrent que la structure du composé A est celle d'une acridone N-méthylée. L'hydrolyse chlorhydrique à chaud du tétrazépam conduit donc à l'obtention de chloro-7 N-méthyl-10 hexahydro-1,2,3,4,4a,9a acridone par cyclisation intramoléculaire de la méthylamino-2 chloro-5-benzoylcyclohexène-1' yl, composé intermédiaire non isolé, selon le même type de réaction que celui mentionné à propos du tétrazépam N_1-déméthylé.

3324 - Etude analytique des acridones obtenues par traitement chlorhydrique du tétrazépam et de son dérivé N_1-déméthylé.

Les résultats de l'étude analytique de la chloro-7 hexahydro-1,2,3,4,4a,9a acridone et de son dérivé N_{10}-méthylé, réalisée dans les conditions précisées précédemment, sont rassemblés dans le *Tableau XIV*.

333 - *Composé obtenu par acétylation de la chloro-7 hexahydro-1,2,3,4,4a,9a acridone*.

La structure du composé obtenu par hydrolyse du tétrazépam N_1-déméthylé a été confirmée par la préparation de son dérivé d'acétylation.

3331 - Conditions opératoires

Dans un erlenmeyer, 500 milligrammes de chloro-7 hexahydro-1,2,3,4,4a,9a acridone sont dissous rapidement dans 20 ml d'anhydre acétique en présence de 8 grammes de chlorure de zinc anhydre.
La solution est placée durant une minute dans un bain-marie à 70° C, puis 90 secondes à la température du laboratoire.
Après refroidissement dans un bain d'eau glacée durant cinq minutes, le récipient étant toujours maintenu dans la glace, on ajoute lentement 30 ml d'eau distillée (les quatre premiers millilitres étant ajoutés goutte à goutte). Cette dilution entraîne la précipitation de l'acridone non acétylée, qui est éliminée par filtration. Après addition de 100 ml d'eau distillée au filtrat, on observe la précipitation d'un nouveau composé qui est recueilli par filtration, lavé à l'eau distillée et séché. L'analyse chromatographique en phase gazeuse de ce composé montre qu'il renferme environ 1,3 % d'impureté constituée par de l'acridone non acétylée. La purification est effectuée par chromatographie sur colonne de florisil dans les conditions suivantes.

SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION DANS L'ULTRA-VIOLET

1) Solutions méthanoliques	λ max (en nm)	λ min.
Hexahydroacridone	235, 265	252
Méthyl-10 hexahydroacridone	238, 272	256
2) Solutions dans l'acide chlorhydrique 2N		
Hexahydroacridone	213, 243	228
Méthyl-10 hexahydroacridone	216, 243	228
3) Solutions dans la soude 0,2N		
Hexahydroacridone	236, 260	220, 255
Méthyl-10 hexahydroacridone	241, 272	217, 261

CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE-MINCE D'ADSORBANT

	Rf absolu	Rf relatif
Benzophénone (Subst. référence)	0,70	/
Hexahydroacridone	0,58	0,83
Méthyl-10 hexahydroacridone ..	0,67	0,96

CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (210° C)

	DR (cm)	TR (mn et 1/100)	D'R = T'R	K'X
Oxazépam (subst. référence) ..	14,01	33,12	/	/
Diazépam (étalon interne)	/	/	/	/
Hexahydroacridone	7,85	18,55	0,56	1,05
Méthyl-10 hexahydroacridone ..	7,85	18,55	0,56	1,06

SPECTROFLUORIMETRIE

	Milieu	λ max. excitation	λ max. émission
Hexahydroacridone	méthanol	396 nm	495 nm
Méthyl-10 hexahydroacridone ..	méthanol	413 nm	516 nm

SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION DANS LE VISIBLE APRES DIAZOCOPULATION

Nous n'avons obtenu aucune coloration en employant le protocole opératoire antérieurement décrit ce qui est en accord avec la structure chimique des deux acridones étudiées.

POINTS DE FUSION

Hexahydroacridone ..... 232 - 233° C.
Méthyl-10 hexahydroacridone .. 93 - 94° C.

TABLEAU XIV : ETUDE ANALYTIQUE DES ACRIDONES OBTENUES PAR TRAITEMENT CHLORHYDRIQUE DU TETRAZEPAM ET DE SON DERIVE N_1-DEMETHYLE.

Le composé lavé et séché est dissous dans le minimum d'hexane et fixé en tête de colonne.
L'acridone non acétylée est éluée par du benzène et la solution benzénique est éliminée. Le composé acétamidé est alors élué par le mélange benzène - méthanol (9/1). La solution benzène - méthanol est évaporée et le résidu dissous dans un minimum de méthanol. Par cristallisation, on obtient un composé qui se présente sous la forme d'aiguilles blanches insolubles dans l'eau.

3332 - Identification et structure du composé obtenu

Les résultats de l'étude analytique sont les suivants :

1°) Formule brute $C_{15} H_{16} N O_2 Cl$

	C	H	N	Cl
Calculé	64,86	5,76	5,04	12,79
Trouvé	64,74	5,84	5,02	12,46

2°) Spectre infra-rouge :
On observe en particulier :
deux fonctions carbonyles (1.715 cm^{-1} et 1.670 cm^{-1}).

3°) Spectre de masse :
On observe deux pics; l'un correspond à un composé de masse 277 (^{35}Cl), l'autre à un composé de masse 279 (^{37}Cl).

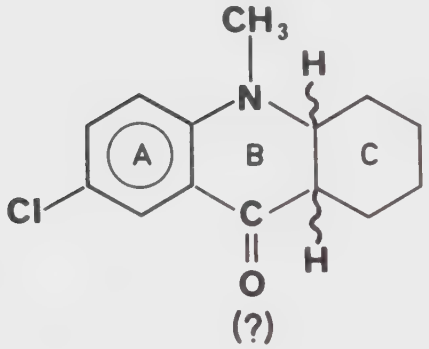
La masse théorique de l'acridone acétamidée est 277,5. Les résultats analytiques ci-dessus, relatifs au composé obtenu par acétylation du produit formé par hydrolyse acide du tétrazépam N_1-déméthylé, confirment la structure de la chloro-7 hexahydro-1,2,3,4,4a,9a acridone.

334 - *Nature du second composé obtenu par hydrolyse acide du tétrazépam.*

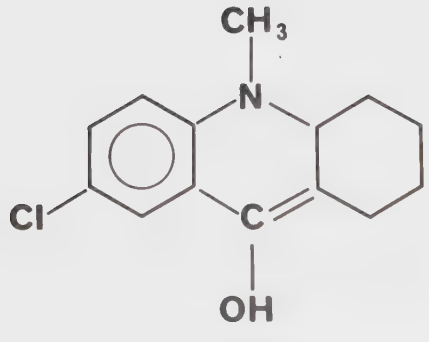
3341 - Hypothèse concernant la nature du composé

Comme nous l'avons précédemment signalé, l'hydrolyse acide du tétrazépam (HCl 1,0 N - 30 minutes - 100° C) conduit à l'obtention de deux composés (A et B) dont le plus important (A) après analyse, a été identifié à la chloro-7 N-méthyl-10 hexahydro-1,2,3,4,4a,9a acridone.

Le second composé (B) que nous avons isolé dans les conditions ci-dessous pouvait être notamment soit l'isomère de jonction des cycles B et C, soit la forme énolique.



(?)



(?)

3342 - Conditions opératoires

Après hydrolyse (durée, température et concentration identiques à celles mentionnées pour l'obtention de l'acridone N-substituée) en milieu chlorhydrique 4N *(cf Chapitre 33221)*, la solution acide est refroidie puis soumise à l'extraction par de l'hexane. Après évaporation de la phase organique le résidu est dissous dans le minimum d'éther dépéroxydé. L'évaporation, sous courant d'azote, de la solution conduit à la cristallisation sous forme de losange d'un mélange de composés qui renferme environ 15 % d'acridone N-substituée et 85 % de composé B. Les cristaux sont rapidement lavés avec du méthanol puis dissous dans un mélange à parties égales d'éther - méthanol.
Après élimination de l'éther par évaporation à la température du laboratoire, l'acridone N-substituée (composé A) reste en solution alcoolique alors que le composé B précipite. Le composé B est recueilli par filtration puis lavé rapidement avec du méthanol.
L'étude chromatographique en phase gazeuse montre que le composé B n'est pas pur mais renferme encore 3 % d'acridone N-substituée. C'est cet échantillon du composé inconnu qui a été soumis à l'analyse.

3343 - Identification et structure du composé

Après avoir vérifié par étude spectrométrique, que le composé isolé avait une masse de 249,5 [trouvé 249 (^{35}Cl) et 251 (^{37}Cl)], nous avons enregistré le spectre infra-rouge. On observe en particulier :

- aucune bande de vibration entre 3610 - 3640 cm^{-1}, ce qui exclut la présence d'une fonction -OH.
- une bande de vibration à 1670 cm^{1} qui, comme dans le cas de l'acridone N-substituée est en faveur de l'existence d'une fonction carbonyle.

Les résultats de l'étude spectrophotométrique dans l'infrarouge excluent donc pour le composé B une structure énolique.

Nous avons alors envisagé la possibilité d'existence, pour l'acridone N-substituée, de deux isomères cis et trans. L'identification de chacun des isomères a été réalisée par spectrométrie de résonance magnétique nucléaire.

Après irradiation du groupement méthylénique en position 4, irradiation destinée à supprimer le couplage entre le proton 4a et les deux protons méthyléniques en 4, de façon à ne voir que le couplage du proton 4a avec le proton 9a, on observe :
- pour le composé A, une constante de couplage de 5 - 6 cps ;
- pour le composé B, une constante de couplage de 13 - 14 cps .

La constante de couplage axial - axial de 5 - 6 cps correspond à l'isomère cis alors que la constante de couplage de 13 - 14 cps correspond à l'isomère trans.

Les composés A et B sont donc respectivement les isomères cis et trans de la chloro-7 N-méthyl-10 hexahydro-1,2,3,4,4a,9a acridone.

La construction des modèles chimiques montre que le composé le plus stable est l'isomère trans (composé B), aussi le mécanisme de la réaction d'hydrolyse du tétrazépam semble être le suivant.

L'action de l'acide chlorhydrique, à 100° C, sur le tétrazépam conduit à la formation d'un composé intermédiaire, non isolé, l'amino-2 chloro-5 benzoylcyclohéxène-1'yl, qui, par cyclisation intramoléculaire, aboutit tout d'abord à l'isomère cis (produit cinétique) aux dépens duquel se forme ensuite l'isomère trans.

Le troisième composé (C) qui apparaît pour des normalités en acide chlorhydrique supérieures à 4 N, n'a pu être isolé à l'état suffisamment pur. Nous pensons qu'il s'agit vraisemblablement, compte tenu des conditions (normalité, température), d'un produit de décomposition du tétrazépam.

34 - *ETUDE ANALYTIQUE DU MEDAZEPAM*

341 - *Etude analytique du médazépam et de son dérivé N_1-déméthylé*

Comme nous l'avons précédemment rappelé *(Chapitre 13)*, les principaux métabolites du médazépam sont :

- dans le plasma : les dérivés N_1-déméthylés du médazépam et du diazépam.
- dans les urines: l'oxazépam.

L'étude analytique concernant le médazépam et son dérivé N_1-déméthylé a été effectuée en utilisant les méthodes décrites antérieurement.

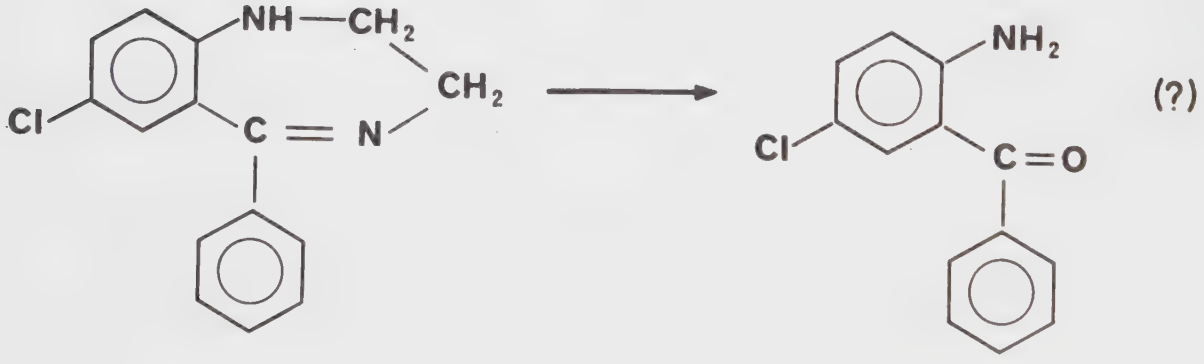
Les résultats sont rassemblés dans le *Tableau XV*.

342 - *Etude analytique des composés obtenus par traitement chlorhydrique à chaud du médazépam et de son dérivé N_1-déméthylé*

3421 - Hypothèse concernant la nature des composés formés

Comme nous l'avons rappelé au *chapitre 3321*, l'hydrolyse chlorhydrique (HCl 4N, 30 minutes à 100° C) du diazépam N_1-déméthylé conduit à la formation d'amino-2 chloro-5 benzophénone.

Compte tenu de l'analogie de structure entre le diazépam N_1-déméthylé et le médazépam N_1-déméthylé, l'application à ce dernier de la technique d'hydrolyse précédemment décrite devrait également conduire à l'obtention d'amino-2 chloro-5 benzophénone.



(?)

Dans les mêmes conditions, il devrait se former de la méthylamino-2 chloro-5 benzophénone par hydrolyse du médazépam.

SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION DANS L'ULTRA-VIOLET

1) Solutions méthanoliques	λ max. (en nm)	λ min.
Médazépam	231	211
Médazépam N_1-déméthylé	231	211

2) Solutions dans l'acide chlorhydrique 2N		
Médazépam	212, 252	208, 227
Médazépam N_1-déméthylé	212, 252	209, 225

3) Solutions dans la soude 0,2 N		
Médazépam	232	220
Médazépal N_1-déméthylé	231	222

CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE-MINCE D'ADSORBANT

	Rf absolu	Rf relatif
Diazépam (subst. référence)	0,80	/
Médazépam	0,85	1,07
Médazépam N_1-déméthylé	0,76	0,96

CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (250° C.)

	DR (cm)	TR (mn et 1/100)	D'R = T'R	K'_x
Diazépam (subst. référence)	4,60	10,87	/	/
Médazépam	2,30	5,42	0,50	0,76
Médazépam N_1-déméthylé	3,25	7,66	0,69	1,05

SPECTROFLUORIMETRIE

	Milieu	λ max. (excitation)	λ min. (émission)
Médazépam	H_2SO_4	345 nm	485 nm
Médazépam N_1-déméthylé	H_2SO_4	353 nm	481 nm

SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION DANS LE VISIBLE APRES DIAZOCOPULATION

Nous n'avons obtenu aucune coloration en employant le protocole opératoire antérieurement décrit ce qui est en parfait accord avec la structure chimique des deux molécules étudiées.

TABLEAU XV : ETUDE ANALYTIQUE DU MEDAZEPAM ET DU MEDAZEPAM N_1-DEMETHYLE.

3422 - Conditions opératoires

L'hydrolyse du médazépam ou de son dérivé N_1-déméthylé a été conduite dans les conditions suivantes.

- concentration de la solution: 1 mg/ml,
- temps d'hydrolyse : 30 minutes,
- température : 100° C,
- solution dans l'acide chlorhydrique : 2 N.

Après refroidissement dans un bain d'eau glacée, la solution est agitée avec de l'éther éthylique déperoxydé. La phase éthérée est recueillie, lavée une fois avec 100 ml d'eau distillée, séchée sur sulfate de sodium anhydre puis évaporée sous vide à une température voisine de 50° C. Le produit obtenu, après cristallisation dans le mélange éther-méthanol (1/4), a été analysé.

Les composés obtenus par hydrolyse, dans les conditions ci-dessus, du médazépam ou de son dérivé N-déméthylé se présentent sous forme de fines aiguilles jaune-orangées.

3423 - Identification et structure des composés obtenus

34231 - Composé obtenu par hydrolyse du Médazépam N_1-déméthylé

Sur le produit obtenu dans les conditions précédemment décrites, nous avons pratiqué une réaction de diazocopulation, dont le résultat a été négatif; ce résultat inattendu, exclut la présence d'une fonction amine aromatique primaire dans la structure chimique du composé isolé.

Ne disposant que de très peu de produit, nous n'avons pu identifier le composé formé. Cependant, la réaction de diazocopulation étant négative, nous pouvons en déduire que la substitution de l'atome d'oxygène du carbone 2 du cycle hétéroatomique par deux atomes d'hydrogène semble apporter une grande stabilité à la liaison N_1-C_2 qui ne peut donc être rompue par traitement acide dans les conditions précédentes.

34232 - Composé obtenu par hydrolyse du médazépam

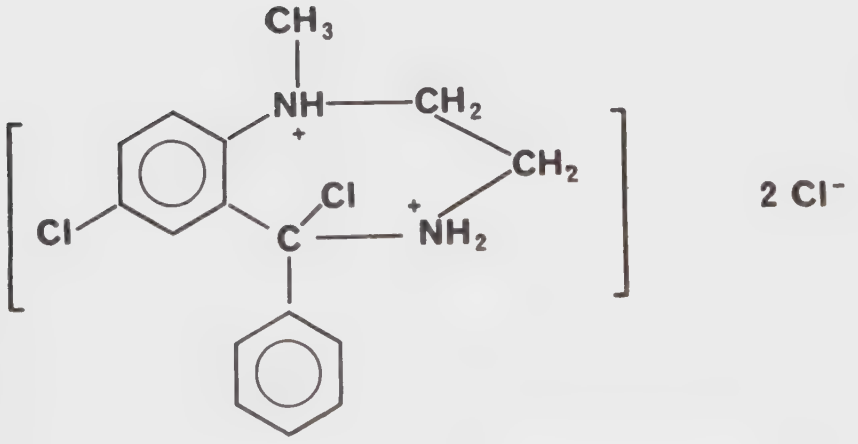
Le produit formé à partir du médazépam dans les conditions rappelées ci-dessus, a été soumis à l'identification.
Les résultats obtenus sont les suivants.

1°) Formule brute $C_{16}\ H_{18}\ N_2\ Cl_4$

	C	H	N	Cl
Calculé	50,40	4,76	7,36	37,50
Trouvé	50,16	4,34	7,18	37,94

2°) Spectre infra-rouge
Enregistré en pastille de chlorure de sodium, il met en évidence :
une fonction NH_2^+ (2.640 cm^{-1})
une fonction NH^+ (1.840 cm^{-1})

3°) Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire.
Il n'a pas été possible d'enregistrer le spectre de R.M.N. En effet, le produit se décompose en redonnant le médazépam.
A la lumière de ces quelques résultats analytiques, nous avons alors envisagé *(38)* la formation d'un composé d'addition, dont la formule est représentée ci-dessous.



Le dichlorhydrate de dichloro-5,7 dihydro-2,3 méthyl-1 phényl-5 benzo (f)-1 H diazépine-1,4 se décompose facilement par élévation de température ce qui, d'une part empeche la réalisation de l'étude spectrométrique de masse et d'autre part, explique que ce composé ait les mêmes Rf absolu et relatif que le médazépam lors de l'étude chromatographique en phase gazeuse. Inversement cette instabilité thermique est en faveur de la structure que nous proposons.

Dans le cas du médazépam N_1-déméthylé le composé obtenu serait le dichlorhydrate de dichloro-5,7 dihydro-2,3 phényl-5 benzo (f)-1 H diazépine 1,4 dont la structure expliquerait que nous n'ayons pas obtenu de réaction de diazocopulation positive.

Afin de garder une unité à notre travail et pour simplifier l'exposé de nos résultats, nous qualifierons également de "produit d'hydrolyse" le composé isolé après traitement à chaud en milieu chlorhydrique du médazépam ou de son dérivé N_1-déméthylé.

3424 - Etude analytique des composés obtenus par traitement chlorhydrique du médazépam et de son dérivé N_1 déméthylé

Les résultats du comportement analytique des composés d'addition obtenus par chauffage en milieu chlorhydrique du médazépam et de son dérivé N_1-déméthylé, dans les conditions antérieurement décrites, sont résumés dans le *Tableau XVI*

Comme nous l'avons signalé à propos de l'étude spectrométrique de résonance magnétique nucléaire, les produits obtenus ne sont stables qu'à l'état cristallisé. En solution ils s'hydrolysent en redonnant naissance respectivement au médazépam et à son dérivé N_1-déméthylé ce qui explique, dans ce cas très particulier, que de nombreux résultats analytiques soient communs aux benzodiazépines et à leur "produit d'hydrolyse" (absorption dans l'U.V. C.P.G.).

D'autre part, lors de l'étude par C.P.G. du médazépam N_1-déméthylé (ou de son "produit d'hydrolyse" chlorhydrique) la substance de référence sera le diazépam et non plus l'oxazépam,

qui présente les mêmes Rf absolu et relatif que le dérivé N_1-déméthylé du médazépam (ou son "produit d'hydrolyse" chlorhydrique).
Enfin, il est évident, compte tenu de la structure des composés étudiés, qu'une réaction de diazocopulation pratiquée sur ces produits conduit à un résultat négatif.

343 - *Nature du composé obtenu par acétylation du dichlorhydrate de dichloro-5,7 dihydro-2,3 méthyl-1 phényl-5 benzo (f) 1 H-diazépine-1,4*

3431 - Conditions opératoires

Le composé obtenu par "hydrolyse" chlorhydrique à chaud du médazépam a été soumis à l'action de l'anhydride acétique dans les conditions suivantes.
Après dissolution à chaud, dans l'anhydride acétique (concentration du produit 1 mg/ml) la solution est abandonnée pendant 24 heures à la température du laboratoire. Après dilution au 1/5 avec de l'eau distillée, il apparaît un précipité jaune qui est extrait par le chloroforme.
Le composé formé est purifié par chromatographie sur une petite colonne de florisil comme il est indiqué ci-dessous.
La solution chloroformique est évaporée sous vide. Le résidu est repris par le minimum de chloroforme puis fixé à la partie supérieure de la colonne de florisil.
Une première élution par du benzène permet d'éliminer le produit non transformé. Une seconde élution par le mélange benzène-éther (1 - 1) entraîne le composé jaune qui est recueilli à la partie inférieure de la colonne. Après évaporation de la solution organique on obtient un composé amorphe de couleur jaune, qui a été soumis à l'identification.

SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION DANS L'ULTRA-VIOLET

1) Solutions méthanoliques

	λ max (en nm)	λ min.
"produit d'hydrolyse" du médazépam	231	211
"produit d'hydrolyse" du médazépam N_1-déméthylé	231	211

2) Solutions dans l'acide chlorhydrique 2N

"produit d'hydrolyse" du médazépam	212, 252	208, 227
"produit d'hydrolyse" du médazépam N_1-déméthylé	212, 252	209, 226

3) Solutions dans la soude 0,2 N

"produit d'hydrolyse" du médazépam	232	220
"produit d'hydrolyse" du médazépam N_1-déméthylé	231	222

CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE-MINCE D'ADSORBANT

	Rf absolu	Rf relatif
Benzophénone (substance de référence)	0,70	/
"produit d'hydrolyse" du médazépam	0,36	0,52
"produit d'hydrolyse" du médazépam N_1-déméthylé	0,09	0,14

CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

	DR (cm)	TR (mn et 1/100)	D'R T'R	K'x
Oxazépam (substance de réf.)	13,85	32,74	/	/
Diazépam (étalon interne)	/	/		
"produit d'hydrolyse" du médazépam	8,86	20,94	0,64	0,54
"produit d'hydrolyse" du médazépam N_1-déméthylé	13,85	32,74	1	0,73

TABLEAU XVI . ETUDE ANALYTIQUE DES "PRODUITS D'HYDROLYSE" CHLORHYDRIQUE DU MEDAZEPAM ET DE SON DERIVE N_1-DEMETHYLE.

3432 - Identification et structure du composé obtenu

1°) Formule brute $C_{18}\ H_{19}\ N_2\ O\ Cl$

	C	H	N	Cl
calculé	65,35	5,79	8,46	10,71
trouvé	65,78	6,02	8,22	10,57

2°) Spectre de masse.
On observe deux pics.
L'un correspond à un composé de masse 330 (^{35}Cl);
l'autre à un composé de masse 332 (^{37}Cl).

3°) Spectre de résonance magnétique nucléaire.

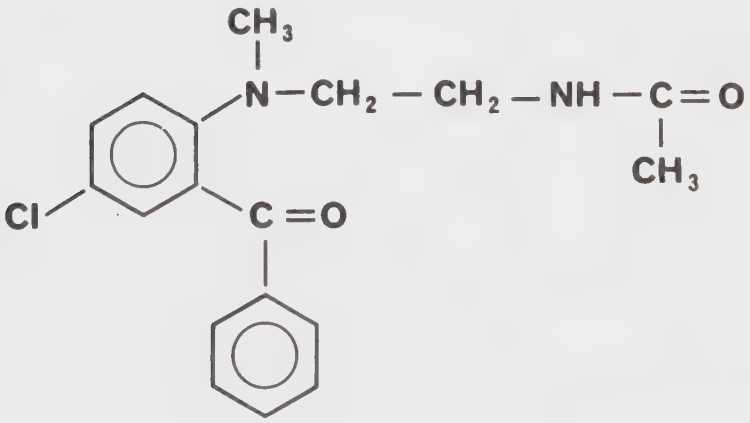
L'exploitation du spectre obtenu montre la présence :

- **d'un radical méthyl situé à 2,60 ppm, caractéristique d'un groupement = N-CH_3**
- **d'un radical méthyl situé à 1,70 ppm, caractéristique d'un groupement -CO-CH_3**
- **de deux méthylènes (4 protons) situés à 3,18 ppm, placés en α d'un azote.**
- **d'un proton situé à 6,40 ppm et placé sur l'azote de la fonction acétamide (-NH-CO-CH_3).**

4°) Spectre infra-rouge.
Enregistré en pastille de NaCl, il met en évidence :
une fonction -NH- (3.300 cm^{-1})
deux fonctions carbonyles (1.640 - 1.690 cm^{-1}).

Ces résultats traduisent la formation de

N [(benzoyl-2 chloro-5 N -méthylanilino)-2 éthyl] acétamide
dont la structure est représentée ci-dessous.



Ce produit se différencie du médazépam par chromatographie sur couche mince d'adsorbant et par chromatographie gaz-liquide.

35 - *APPLICATION DES TECHNIQUES ANALYTIQUES MISES AU POINT A L'ENSEMBLE DES BENZODIAZEPINES-1,4 UTILISEES EN THERAPEUTIQUE*

Si les travaux concernant les essais pharmacologiques et cliniques, parce qu'intéressant directement l'utilisation thérapeutique, sont nombreux, par contre ceux relatifs à l'étude analytique des dérivés de la benzodiazépine-1,4 sont plus rares. On ne trouve, en effet, dans la littérature, que des travaux isolés et souvent fragmentaires.

Aussi, après l'étude analytique du médazépam et du tétrazépam, à propos desquels aucun travail n'avait été antérieurement réalisé, nous avons entrepris une étude de l'ensemble des dérivés de la benzodiazépine actuellement utilisés en France.

Comme nous l'avons précédemment souligné, l'étude analytique des benzo-(f)-diazépine-1,4 présente cette caractéristique qu'elle peut être réalisée en s'adressant soit directement à ces composés (ou à leurs métabolites qui présentent souvent du point de vue physico-chimique de grandes analogies avec les molécules médicamenteuses dont ils dérivent), soit aux produits formés par chauffage en milieu acide des substances précédentes. C'est la raison pour laquelle nous avons divisé notre travail en deux parties. Nous rapportons d'abord les résultats de l'étude analytique, dans les conditions antérieurement décrites, des benzodiazépines et de leurs principaux métabolites puis après avoir donné le mode de préparation des produits obtenus par chauffage en milieu chlorhydrique de l'ensemble des produits précédents, nous rapportons les résultats obtenus dans leur étude analytique.

351 - *Benzodiazépines et métabolites*

Les composés qui font l'objet de notre travail sont :

- benzodiazépines : chlordiazépoxide, clorazépate, diazépam médazépam, nitrazépam, oxazépam et tétrazépam.
- métabolites : dérivés N-déméthylés du chlordiazépoxide, du diazépam, du médazépam et du tétrazépam : dérivés 7-aminé et 7-acétamidé du nitrazépam.

3511 - Résultats obtenus

35111 - Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultra-violet

Nous avons opéré dans des conditions identiques à celles mentionnées au *Chapitre 321*.
Les résultats sont rassemblés dans les *Tableaux XVII, XVIII et XIX*.

On constate que seuls les spectres du chlordiazépoxide, du nitrazépam et de leurs métabolites sont suffisamment caractéristiques pour permettre une identification aisée.
Ceux des autres benzodiazépines et de leurs métabolites N-déméthylés sont très voisins; aussi, lorsque la substance médicamenteuse est inconnue, l'identification par spectrophotométrie ultra-violette ne sera possible que dans le cas du chlordiazépoxide ou du nitrazépam.
Pour les autres composés, on devra se contenter d'indiquer la présomption de présence d'un dérivé de la benzo-(f)-diazépine-1,4 sans pouvoir en préciser la nature exacte.

35112 - Chromatographie sur couche-mince d'adsorbant

Nous avons opéré dans les conditions indiquées au *Chapitre 322* et les résultats sont rassemblés dans le *Tableau XX*.

35113 - Chromatographie en phase gazeuse

Les conditions opératoires sont celles indiquées au *Chapitre 323*.
Les Tableaux XXI et XXII rassemblent :
- les distances et temps de rétention absolus de chacun des produits;

- les distances et temps de rétention relatifs mesurés par rapport au diazépam choisi comme substance de référence.

On constate que dans les conditions d'expérience utilisées, le clorazépate dipotassique ne conduit à aucun pic.
L'élévation de température de la colonne de 30° C (280° C au lieu de 250° C) permet de réduire considérablement le temps de rétention de l'acétamido-7 nitrazépam.
Le calcul des coefficients de proportionnalité relatifs (K'x) et la mise en évidence de l'invariabilité de ces coefficients ont été réalisés de façon suivante :
Pour chacune des substances étudiées nous avons utilisé des solutions de concentrations différentes et connues.

Solution A	produit	2 mg/ml
	étalon	1 mg/ml
Solution B	produit	1 mg/ml
	étalon	1 mg/ml
Solution C	produit	0,5 mg/ml
	étalon	1 mg/ml

Les résultats sont résumés dans les *Tableaux XXIII et XXIV*.

Pour le nitrazépam, nous avons constaté une réponse de la colonne inférieure à celle donnée pour les autres benzodiazépines et une variation de K'x en fonction des quantités injectées. Un dosage du nitrazépam reste cependant possible à

	λ max. (± 1 nm)	λ min. (± 1 nm)	CEM au λ max.
Chlordiazépoxide	210, 246, <u>265</u>	221, 254	36.500
Clorazépate	<u>231</u>, palier entre 302 et 327	pas de minimum distinct	35.500
Diazépam	<u>230</u>, 320	290	36.500
Médazépam	<u>231</u>, épaulement à 248	211	19.000
Nitrazépam	<u>220</u>, 260, 310	242, 294	26.000
Oxazépam.....	<u>230</u>, 320	301	37.000
Tétrazépam	<u>229</u>, 310	295	30.000
Chlordiazépoxide déméthylé	211, 247, <u>264</u>	221, 252	29.000
Diazépam déméthylé	<u>229</u>, 306	289	33.000
Médazépam déméthylé	<u>231</u>	211	23.000
Nitrazépam aminé en 7	211, <u>244</u>, 353	220, 315	30.000
Nitrazépam acétamidé en 7	215, <u>247</u>, 329	224, 302	31.500
Tétrazépam déméthylé	<u>227</u>, 312	295	33.000

TABLEAU XVII : *VALEURS DES LONGUEURS D'ONDE DES MAXIMA ET DES MINIMA D'ABSORPTION DANS L'ULTRA-VIOLET.*

SOLUTIONS $2 . 10^{-5}$ M dans le METHANOL.

	λ max. (± 1 nm)	λ min. (± 1 nm)	CEM au λ max.
Chlordiazépoxide	211, 248, 310	223, 292	30.000
Clorazépate	211, 240, 287, 364	221, 264, 335	31.000
Diazépam	210, 241, 288, 360	222, 265, 355	31.000
Médazépam	212, 252	208, 227	22.000
Nitrazépam	213, 282 palier à 338	240	25.500
Oxazépam	211, 239, 287, 362	221, 265, 336	31.000
Tétrazépam	211, 242, 287, 350	220, 267, 324	26.500
Chlordiazépoxide déméthylé	212, 248, 309	222, 281	30.500
Diazépam déméthylé	211, 240, 286, 352	220, 264, 336	30.000
Médazépam déméthylé	212, 252	209, 225	21.000
Nitrazépam aminé en 7	211, 232, 287	217, 259	23.500
Nitrazépam acétamidé en 7	211, 249	228, 337	33.500
Tétrazépam déméthylé	211, 239, 286, 359	217, 264, 325	29.000

TABLEAU XVIII: *VALEURS DES LONGUEURS D'ONDE DES MAXIMA ET DES MINIMA D'ABSORPTION DANS L'ULTRA-VIOLET.*

SOLUTIONS $2 . 10^{-5}$ M dans l'ACIDE CHLORHYDRIQUE 2 N.

	λ max. (± 1 nm)	λ min. (± 1 nm)	CEM au λ max.
Chlordiazépoxide	245, 261	213, 251	33.500
Clorazépate	235, 342	212, 306	31.500
Diazépam	231, 312	212, 300	37.500
Médazépam	232	220	23.500
Nitrazépam	229, 365	217, 315	26.000
Oxazépam	236, 342	211, 307	34.000
Tétrazépam	230	217	31.000
Chlordiazépoxide déméthylé	238, 257	210, 254	31.000
Diazépam déméthylé	234, 342	209, 307	30.500
Médazépam déméthylé	231	222	25.500
Nitrazépam aminé en 7	239, 354	210, 314	29.000
Nitrazépam acétamidé en 7	236, 343	210, 316	30.000
Tétrazépam déméthylé	232, 331	210, 307	30.500

TABLEAU XIX: *VALEURS DES LONGUEURS D'ONDE DES MAXIMA ET DES MINIMA D'ABSORPTION DANS L'ULTRA-VIOLET.*

SOLUTIONS 2 . 10^{-5} M dans la SOUDE 0,2 N.

	Rf absolus	Rf relatifs
Chlordiazépoxide	0,54	0,67
Clorazépate	0,39	0,48
Diazépam (référence)	0,80	1
Médazépam	0,85	1,07
Nitrazépam	0,32	0,39
Oxazépam	0	0
Tétrazépam	0,81	1,01
Chlordiazépoxide déméthylé	0,16	0,21
Diazépam déméthylé	0,36	0,45
Médazépam déméthylé	0,76	0,96
Nitrazépam aminé en 7	0,23	0,28
Nitrazépam acétamidé en 7	0,10	0,12
Tétrazépam déméthylé	0,40	0,50

TABLEAU XX : *CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE D'OXYDE D'ALUMINIUM. VALEURS DES Rf ABSOLUS ET RELATIFS DES BENZODIAZEPINES-1,4 ET DE QUELQUES UNS DE LEURS METABOLITES.*

1° DISTANCES ET TEMPS DE RETENTION ABSOLUS

	D. R. (cm)	T. R. (minutes et 1/100)
Chlordiazépoxide	6,65	15,72
Clorazépate	aucun pic	/
Diazépam	4,60	10,87
Médazépam	2,30	5,42
Nitrazépam	16,20	38,29
Oxazépam	3,25	7,68
Tétrazépam	4,15	9,81

2° DISTANCES ET TEMPS DE RETENTION RELATIFS

	D' R = T' R
Chlordiazépoxide	1,44
Clorazépate	aucun pic
Diazépam (référence)	1
Médazépam	0,50
Nitrazépam	3,52
Oxazépam	0,70
Tétrazépam	0,90

TABLEAU XXI : *ETUDE CHROMATOGRAPHIQUE EN PHASE GAZEUSE.*
VALEURS DES DISTANCES ET TEMPS DE RETENTION ABSOLUS ET RELATIFS DES BENZODIAZEPINES-1,4.

1° DISTANCES ET TEMPS DE RETENTION ABSOLUS

	D. R. (cm)	T. R. (minutes et 1/100)
Chlordiazépoxide déméthylé	6,62	15,62
Diazépam déméthylé	6,53	15,41
Médazépam déméthylé	3,25	7,65
Nitrazépam aminé en 7	17,38	41,01
Nitrazépam acétamidé en 7	52,44	123,75
Tétrazépam déméthylé	5,7	13,45
Diazépam (référence)	4,6	10,87
Nitrazépam acétamidé en 7 (280° C)...	12,5	29,55

2° DISTANCES ET TEMPS DE RETENTION RELATIFS

	D'R = T'R
Chlordiazépoxide déméthylé	1,44
Diazépam déméthylé	1,42
Médazépam déméthylé	0,69
Nitrazépam déméthylé	3,78
Nitrazépam aminé en 7	11,40
Tétrazépam déméthylé	1,24
Nitrazépam acétamidé en 7 (280° C)...	8,33

TABLEAU XXII : *ETUDE CHROMATOGRAPHIQUE EN PHASE GAZEUSE.*
VALEURS DES DISTANCES ET TEMPS DE RETENTION ABSOLUS ET RELATIFS DES METABOLITES DES BENZODIAZEPINES-1,4.

condition de définir les domaines de mesure correspondants aux différentes valeurs de K'x.
Enfin, il apparaît qu'une détermination quantitative, en particulier pour les dérivés aminés, n'est possible, avec précision et avec l'appareillage utilisé, que pour des quantités de substance supérieures à 1 microgramme.

35114 - Spectrofluorimétrie

L'étude spectrofluorimétrique n'est satisfaisante que lorsque le composé est suffisamment pur. Une telle étude n'est donc possible que si l'on dispose de la molécule médicamenteuse non altérée (gélule - comprimé - ampoule). En Toxicologie clinique, l'identification par cette méthode ne sera alors envisagée dans dans le cas des liquides gastriques (aspiration, lavage) car dans les autres milieux biologiques, le composé sera soit entièrement métabolisé, soit associé à ses métabolites dont il est très difficile de réaliser une séparation. C'est la raison pour laquelle nous ne rapportons que les résultats obtenus, dans les conditions décrites au *Chapitre 324*, pour les molécules médicamenteuses proprement dites.
Les résultats sont rassemblés dans le tableau ci-dessous.

SUBSTANCE	ACIDE	λ max. (excitation)	λ max. (émission)
Chlordiazépoxide	H_2SO_4	310 nm	530 nm
Clorazépate	H_2SO_4	388 nm	508 nm
Diazépam	H_2SO_4	295 nm	490 nm
Médazépam	H_2SO_4	345 nm	485 nm
Nitrazépam	$HClO_4$	300 nm	465 nm
Oxazépam	H_3PO_4	360 nm	475 nm
Tétrazépam	H_3PO_4	398 nm	492 nm

1° ETALON INTERNE : DIAZEPAM

	Sol. A	Sol. B	Sol. C
Chlordiazépoxide	2,67	2,68	2,62
Clorazépate	aucun pic		
Médazépam	0,76	0,76	0,76
Oxazépam	1,53	1,53	1,54
Tétrazépam	1,22	1,21	1,24

2° ETALON INTERNE : TETRAZEPAM

	Sol. A	Sol. B	Sol. C
Diazépam	0,82	0,82	0,82

3° CAS PARTICULIER DU NITRAZEPAM

	Sol. A	Sol. B	Sol. C
Nitrazépam	2	2,4	4,88

TABLEAU XXIII: *ETUDE CHROMATOGRAPHIQUE EN PHASE GAZEUSE.*
VALEURS DES COEFFICIENTS DE PROPORTIONNALITE RELATIFS : K'_X DES BENZODIAZEPINES-1,4.

1° TEMPERATURE DE LA COLONNE : 250° C

	Sol. A	Sol. B	Sol. C
Chlordiazépoxide déméthylé (*)		5,01	
Diazépam déméthylé	1,36	1,35	1,33
Médazépam déméthylé	1,03	1,05	1,05
Nitrazépam aminé en 7	1,51	1,49	2,30
Tétrazépam déméthylé	1,23	1,24	1,24

(*) Le produit n'est pas pur (3 pics). Il n'est pas possible de préparer une solution de concentration supérieure à 1 mcg/mcl (Sol. B).
La faible sensibilité ne permet pas de faire une mesure valable pour la solution C.

2° TEMPERATURE DE LA COLONNE : 280° C

	Sol. B
Nitrazépam acétamidé en 7	3,41

TABLEAU XXIV : *ETUDE CHROMATOGRAPHIQUE EN PHASE GAZEUSE.*

VALEURS DES COEFFICIENTS DE PROPORTIONNALITE RELATIFS

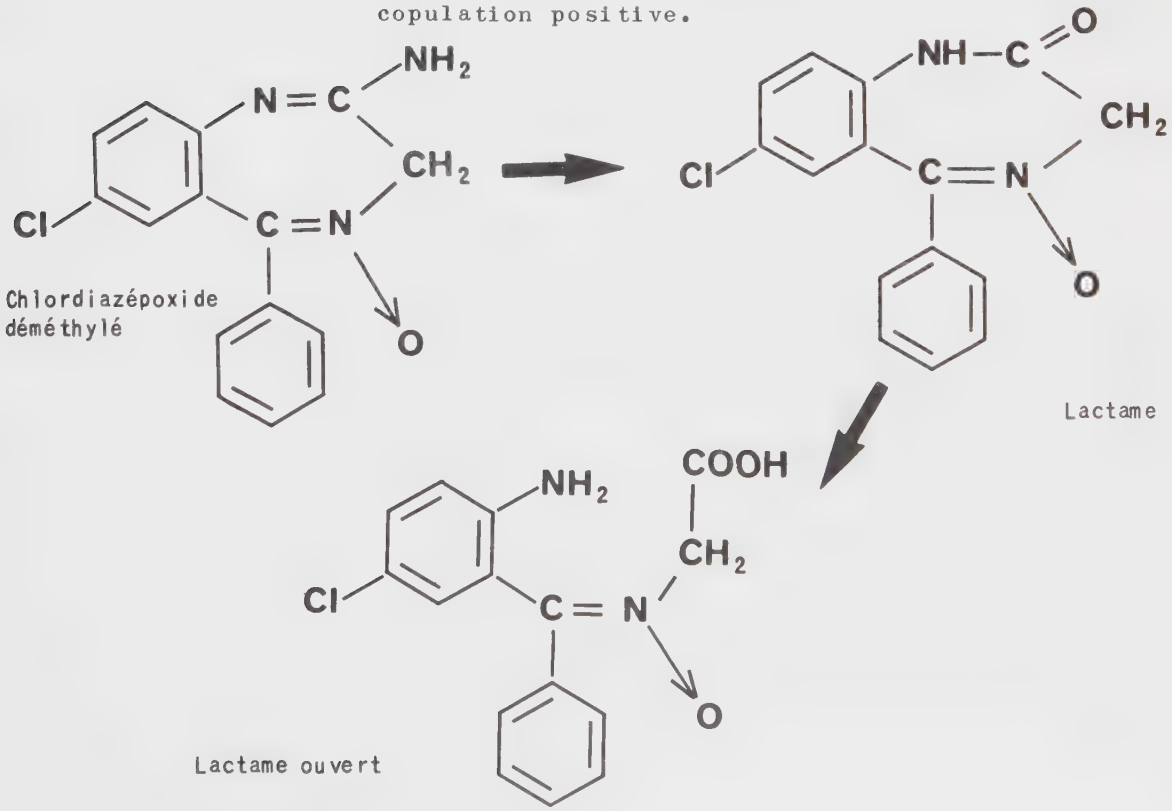
K'_X DES METABOLITES DES BENZODIAZEPINES-1,4.

35115 - Spectrophotométrie dans le visible
après diazocopulation

Nous avons pratiqué une réaction de diazocopulation sur l'ensemble des benzodiazépines et des métabolites déjà mentionnés, en opérant dans les conditions antérieurement décrites *(Chapitre 325)*.
Nous avons obtenu une réaction positive avec les deux composés suivants :

- nitrazépam aminé en 7 : λ max. = 545 nm C.E.M. = 51.000
- chlordiazépoxide déméthylé .....: λ max. = 540 nm C.E.M. = 276.

S'il est normal d'obtenir une réaction de diazocopulation positive avec le nitrazépam aminé en 7, il n'en va pas de même pour le chlordiazépoxide déméthylé.
Nous avons d'abord envisagé une hydrolyse partielle en amino-2 chloro-5 benzophénone, mais il est alors difficile d'expliquer pourquoi le chlordiazépoxide lui-même ne s'hydrolyse pas. Aussi nous pensons, qu'il est vraisemblable qu'une faible partie du dérivé déméthylé se transforme en lactame qui, après ouverture, conduit à une réaction de diazocopulation positive.



352 - *Composés obtenus par traitement chlorhydrique à chaud des benzodiazépines et de leurs métabolites*

3521 - Rappel concernant la nature chimique des composés obtenus par hydrolyse chlorhydrique du chlordiazépoxide, clorazépate, diazépam et du nitrazépam.

L'hydrolyse acide et à température élevée des dérivés de la phényl-5 benzo-(f)-diazépine-1,4 conduit normalement à la formation de benzophénones *(Chapitre 222)*. L'hydrolyse du chlordiazépoxide et du clorazépate conduit à l'obtention d'amino-2 chloro-5 benzophénone, celle du diazépam à la méthylamino-2 chloro-5 benzophénone, celle du nitrazépam à l'amino-2 nitro-5 benzophénone. Rappelons que le nitrazépam subit dans l'organisme une nitroréduction qui conduit à l'obtention de trois métabolites dans la structure chimique desquels le groupement nitré en position 7 est réduit en une fonction amine aromatique primaire.

L'hydrolyse, dans les mêmes conditions que précédemment, de ces trois métabolites du nitrazépam, conduit à la formation de diamino-2,5 benzophénone.
La structure et l'origine de ces quatre cétones sont rassemblées dans le *Tableau XI (Chapitre 222)*.

3522 - Préparation des produits d'hydrolyse

Afin de pouvoir réaliser l'étude analytique de l'ensemble des composés obtenus par hydrolyse acide des benzodiazépines et de leurs métabolites, nous les avons préparés en opérant de la manière suivante.

35221 - Amino-2 chloro-5 benzophénone

Elle a été préparée par hydrolyse de 100 mg de clorazépate en solution aqueuse chlorhydrique 4N pendant 30 minutes au bain-marie bouillant (concentration du clorazépate : 1 mg/ml).
Après refroidissement, l'extraction de la benzophénone est réalisée par 100 ml d'éther dé-

peroxydé. La phase organique est recueillie, lavée une fois avec 100 ml d'eau distillée, séchée sur sulfate de sodium anhydride et évaporée sous vide à une température inférieure à 50° C. Le produit obtenu est recristallisé dans l'alcool méthylique.
L'amino-2 chloro-5 benzophénone se présente sous la forme de fines aiguilles courtes, de couleur jaune paille, insolubles dans l'eau, solubles dans la plupart des solvants organiques.
F = 98° C (banc de KOFLER).

35222 - Méthylamino-2 chloro-5 benzophénone

Elle a été obtenue par hydrolyse de 100 mg de diazépam et en utilisant le protocole opératoire décrit ci-dessus.
La méthylamino-2 chloro-5 benzophénone se présente sous forme de prismes de couleur jaune paille, insolubles dans l'eau, solubles dans la plupart des solvants organiques. F = 95° C.

35223 - Amino-2 nitro-5 benzophénone

Elle a été obtenue à partir de 100 mg de nitrazépam. Les conditions d'hydrolyse sont identiques à celles que nous venons de décrire.
L'amino-2 nitro-5 benzophénone précipite dans la solution acide au cours du refroidissement. Elle est recueillie par centrifugation, lavée à l'eau distillée puis séchée sous courant d'azote à la température du laboratoire, enfin recristallisée dans l'acétate d'éthyle. Le produit obtenu se présente sous la forme de prismes de couleur jaune pâle, insolubles dans l'eau, solubles dans les solvants organiques. F = 161° C.

35224 - Diamino-2,5 benzophénone

Elle a été préparée dans les mêmes conditions que celles décrites pour l'amino-2 chloro-5 benzophénone, par hydrolyse de l'amino-7 phényl-5 oxo-2 benzo-(f)-1H-diazépine-1,4 obtenue par réduction du nitrazépam selon la méthode décrite par RIEDER *(60)*.

100 mg de nitrazépam sont mis en suspension dans 100 ml d'eau distillée. Après addition de 0,60 g d'oxyde de magnésium, le mélange est vigoureusement agité durant une minute. Cinq grammes de dithionite de sodium sont alors ajoutés au milieu et le mélange est soumis à une agitation énergique durant 15 minutes, puis placé dans un bain-marie à 50° C pendant 60 minutes. Après addition de 50 ml d'acide chlorhydrique (d = 1,18) l'hydrolyse du nitrazépam réduit, formé précédemment, est réalisée au bain-marie bouillant durant 30 minutes.

Après refroidissement le soufre est éliminé, par filtration. La solution acide est neutralisée par le carbonate acide de sodium dont l'addition prudente au début, est poursuivie jusqu'à coloration jaune de la solution. La diamino-2,5 benzophénone est extraite par deux fois 100 ml de benzène qui sont évaporés sous vide.

Le produit obtenu se présente sous la forme d'une poudre jaune-orangée, insoluble dans l'eau, soluble dans les solvants organiques. F = 143° C.

Très sensible à l'action de l'oxygène, la diamino-2,5 benzophénone doit être conservée dans une atmosphère de gaz inerte.

35225 - Chloro-7 hexahydro-1,2,3,4,4a,9a acridone

Elle a été obtenue dans les conditions antérieurement décrites *(Chapitre 33211)*.

35226 - Chloro-7 N-méthyl-10 hexahydro- 1,2,3,4,4a,9a acridone

Le mode d'obtention est identique à celui rapporté précédemment *(Chapitre 33222)*.

35227 - Dichlorhydrate de dichloro-5,7 dihydro-2,3 méthyl-1 phényl-5 benzo-(f)- 1 H diazépine-1,4

Les conditions opératoires sont celles indiquées au *Chapitre 3421*.

35228 - Dichlorhydrate de dichloro-5,7 dihydro-2,3 phényl-5 benzo-(f)- 1 H diazépine-1,4

Nous avons opéré dans les mèmes conditions que celles que nous avons décrites antérieurement *(Chapitre 3421)*.

3523 - Comportement analytique des produits d'hydrolyse des benzodiazépines et de leurs principaux métabolites.

35231 - Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultra-violet

Les spectres d'absorption ont été enregistrés à l'aide d'un appareillage et de réactifs identiques à ceux décrits au *Chapitre 321*.
Toutes les déterminations ont été réalisées pour des concentrations $2 . 10^{-5}$ M dans le méthanol, l'acide chlorhydrique 2N ou la soude 0,2 N.
Les résultats obtenus sont rassemblés dans les *Tableaux XXV, XXVI et XXVII*.

35232 - Chromatographie sur couche-mince d'adsorbant

Nous avons procédé à l'étude du comportement chromatographique sur couche-mince, des produits obtenus par hydrolyse chlorhydrique à chaud des

benzodiazépines et de leurs métabolites précédemment cités, dans les conditions indiquées au début de ce travail *(Chapitre 322)*.
Les résultats sont rassemblés dans le *Tableau XXVIII*.

35233 - Chromatographie en phase gazeuse

Le *Tableau XXIX* rassemble :

- les distances et temps de rétention absolus de chacun des produits dans les conditions d'expérience précisées antérieurement *(Chapitre 323)*.
- les distances et temps de rétention relatifs mesurés par rapport à l'oxazépam choisi comme substance de référence.

Lors d'une étude métabolique du médazépam, la substance de référence sera le diazépam, car le composé obtenu par hydrolyse chlorhydrique du médazépam déméthylé et l'oxazépam ont le même Rf absolu.

L'étude quantitative a été réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites pour les benzodiazépines et leurs principaux métabolites *(Chapitre 35.113)*. Les résultats sont rassemblés dans le *Tableau XXX*.

35234 - Spectrofluorimétrie

Les deux dérivés de l'acridone obtenus par hydrolyse chlorhydrique à chaud du tétrazépam et de son dérivé N_1-déméthylé possèdent la propriété intéressante de présenter une intense fluorescence par excitation en lumière de WOOD.
Les spectres de fluorescence de ces deux composés en solution méthanolique ont été enregistrés

	λ max. (± 1 nm)	λ min. (± 1 nm)	CEM au λ max.
Amino-2 chloro-5 benzophénone	209, 237	217	28.500
Méthylamino-2 chloro-5 benzophénone ..	209, 237	217	28.500
Amino-2 nitro-5 benzophénone	239, 357	294	23.500
Diamino-2,5 benzophénone	211, 243	219	33.500
Chloro-7 hexahydro-1,2,3,4,4a,9a acridone	235, 265	252	22.000
Chloro-7 méthyl-10 hexahydro-1,2,3,4, 4a, 9a acridone	238, 272	256	37.000
Dichloro-5,7 dihydro-2,3 méthyl-1 phényl-5 benzo(f)-diazépine-1,4	231 épaulement à 248	211	19.000
Dichloro-5,7 dihydro-2,3 phényl-5 benzo-(f)-diazépine-1,4	231	211	?

TABLEAU XXV : *VALEURS DES LONGUEURS D'ONDE DES MAXIMA ET DES MINIMA D'ABSORPTION DANS L'ULTRA-VIOLET.*

SOLUTIONS $2 . 10^{-5}$ DANS LE METHANOL.

	λ max. (± 1 nm)	λ min. (± 1 nm)	CEM au λ max.
Amino-2 chloro-5 benzophénone	213, 262	239	28.500
Méthylamino-2 chloro-5 benzophénone ..	213, 263	239	26.000
Amino-2 nitro-5 benzophénone	243, 367	289	16.500
Diamino-2,5 benzophénone	211, 260	227	36.000
Chloro-7 hexahydro-1,2,3,4,4a, 9a acridone	213, 243	228	22.000
Chloro-7 méthyl-10 hexahydro-1,2,3,4, 4a, 9a acridone	216, 243	228	28.000
Dichloro-5,7 dihydro-2,3 méthyl-1 phényl-5 benzo-(f)-diazépine-1,4	212, 252	208, 227	15.000
Dichloro-5,7 dihydro-2,3 phényl-5 benzo-(f)-diazépine-1,4	212, 252	209, 226	?

TABLEAU XXVI : *VALEURS DES LONGUEURS D'ONDE DES MAXIMA ET DES MINIMA D'ABSORPTION DANS L'ULTRA-VIOLET.*

SOLUTIONS $2 . 10^{-5}$ M DANS L'ACIDE CHLORHYDRIQUE 2N.

	λ max. (± 1 nm)	λ min. (± 1 nm)	CEM au λ max.
Amino-2 chloro-5 benzophénone	236	217	27.500
Méthylamino-2 chloro-5 benzophénone..	237	217	26.500
Amino-2 nitro-5 benzophénone	245, 365	220, 299	18.000
Diamino-2,5 benzophénone	244	218	13.500
Chloro-7 hexahydro-1,2,3,4,4a,9a acridone	236, 260	220, 255	23.000
Chloro-7 méthyl-10 hexahydro-1,2,3,4, 4a, 9a. acridone	241, 272	217, 261	35.000
Dichloro-5,7 dihydro-2,3 méthyl-1 phényl-5 benzo-(f)-diazépine-1,4	232	220	18.000
Dichloro-5,7 dihydro-2,3 phényl-5 benzo-(f)-diazépine-1,4	231	222	?

TABLEAU XXVII : *VALEURS DES LONGUEURS D'ONDE DES MAXIMA ET DES MINIMA D'ABSORPTION DANS L'ULTRA-VIOLET.*

SOLUTIONS $2 . 10^{-5}$ M DANS LA SOUDE 0,2 N.

	Rf absolus	Rf relatifs
Benzophénone (référence)	0,70	1
Amino-2 chloro-5 benzophénone	0,55	0,79
Méthylamino-2 chloro-5 benzophénone ..	0,77	1,11
Amino-2 nitro-5 benzophénone	0,35	0,50
Diamino-2,5 benzophénone	0,05	0,07
Chloro-7 hexahydro-1,2,3,4,4a,9a acridone	0,58	0,83
Chloro-7 méthyl-10 hexahydro-1,2,3,4, 4a,9a acridone	0,67	0,96
Dichloro-5,7, dihydro-2,3 méthyl-1 phényl-5 benzo-(f)-diazépine-1,4 ...	0,36	0,52
Dichloro-5,7 dihydro-2,3 phényl-5 benzo-(f)-diazépine-1,4	0,09	0,14

TABLEAU XXVIII : *CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE D'OXYDE D'ALUMINIUM.*

VALEURS DES Rf ABSOLUS ET RELATIFS DES PRODUITS D'HYDROLYSE.

à l'aide d'un spectrofluorimètre JOBIN YVON type BEARN avec enregistreur GRAPHIRAC II, type B.G. Cuves en quartz de 1 cm. Les valeurs des longueurs d'onde des maximums d'excitation et d'émission sont les suivantes :

	λ max. (excitation)	λ max. (émission)
chloro-7 hexahydro-1,2,3,4,4a,9a acridone	396 nm	495 nm
chloro-7 N-méthyl-10 hexahydro-1,2,3,4, 4a,9a acridone ...	413 nm	516 nm

35235 - Spectrophotométrie d'absorption dans le visible après diazocopulation

Nous avons pratiqué une réaction de diazocopulation sur l'ensemble des produits d'hydrolyse dans les mêmes conditions que celles exposées au *Chapitre 325*.

Nous avons obtenu une réaction positive avec les composés suivants :

amino-2 chloro 5 benzophénone ... λ max. = 541 nm C.E.M. = 37.000
amino 2 nitro 5 benzophénone .... λ max. = 531 nm C.E.M. = 45.000
diamino 2.5 benzophénone ..... λ max. = 545 nm C.E.M. = 3.000

Rappelons que lors de l'hydrolyse chlorhydrique à chaud du tétrazépam N_1-déméthylé, nous avons montré la présence à l'état de traces, dans les eaux mères acides, d'un composé diazocopulable (λ max. = 540 nm).

	D.R. (cm)	T R (minutes et 1/100)	D.R = T.R
Amino-2 chloro-5 benzophénone	4,65	10,99	0,33
Méthylamino-2 chloro-5 benzophénone..	5,15	12,17	0,37
Amino-2 nitro-5 benzophénone	19,85	46,92	1,43
Diamino-2,5 benzophénone	9,85	23,28	0,71
Chloro-7 hexahydro-1,2,3,4,4a,9a acridone	7,85	18,55	0,56
Chloro-7 méthyl-10 hexahydro-1,2,3,4, 4a,9a acridone	7,85	18,55	0,56
Dichloro-5,7 dihydro-2,3 méthyl-1 phényl-5 benzo-(f)-diazépine-1,4	8,86	20,94	0,64
Dichloro-5,7 dihydro-2,3 phényl-5 benzo-(f)-diazépine-1,4	13,85	32,74	1
Oxazépam (substance de référence) ...	13,85	32,74	

TABLEAU XXIX: *ETUDE CHROMATOGRAPHIQUE EN PHASE GAZEUSE.*

VALEURS DES DISTANCES ET TEMPS DE RETENTION ABSOLUS ET RELATIFS DES PRODUITS D'HYDROLYSE.

	Sol. A	Sol. B	Sol. C
1° ETALON INTERNE : DIAZEPAM			
Amino-2 chloro-5 benzophénone	0,86	0,84	0,95
Méthylamino-2 chloro-5 benzophénone:	0,78	0,78	0,80
Diamino-2,5 benzophénone	1,24	1,26	1,29
Chloro-7 hexahydro-1,2,3,4,4a,9a acridone	1,03	1,05	1,09
Chloro-7 méthyl-10 hexahydro-1,2,3, 4,4a,9a acridone	1,05	1,06	1,11
Dichloro-5,7 dihydro-2,3 méthyl-1 phényl-5 benzo-(f)-diazépine-1,4		0,54	
Dichloro-5,7 dihydro-2,3 phényl-5 benzo-(f)-diazépine-1,4		0,73	
2° ETALON INTERNE : TETRAZEPAM DEMETHYLE			
Amino-2 nitro-5 benzophénone	0,80	0,80	0,80

TABLEAU XXX : *ETUDE CHROMATOGRAPHIQUE EN PHASE GAZEUSE.*

VALEURS DES COEFFICIENTS DE PROPORTIONNALITE RELATIFS

K'_X DES PRODUITS D'HYDROLYSE.

3524 - Composé obtenu par acétylation de la diamino-2,5 benzophénone

Comme nous l'avons antérieurement mentionné, la diamino-2,5 benzophénone, très sensible à l'oxydation, doit être conservée à l'abri de l'oxygène de l'air, dans une atmosphère inerte.

Nous avons alors pensé qu'il serait possible de préparer un dérivé diacétamidé, moins altérable, que nous avons obtenu dans les conditions opératoires suivantes :

Dans un tube à essai, à 200 milligrammes de diamino-2,5 benzophénone, préparée extemporanément *(cf. Chapitre 35224)*, on ajoute 2 ml d'anhydride acétique. Pour aider la dissolution, on peut maintenir le tube quelques secondes dans un bain-marie bouillant.

Si la dissolution n'est pas totale (ce qui est fréquemment le cas), le surnageant acétique est décanté dans un autre tube à essai qui est maintenu ensuite 10 minutes au bain-marie bouillant.

Par refroidissement dans un bain d'eau glacée, apparaît un précipité jaune-brun. Ce précipité est recueilli sur verre fritté, lavé à l'eau distillée puis séché sous vide.

On pratique une seconde acétylation dans les mêmes conditions que celles mentionnées ci-dessus. Après refroidissement, on obtient alors un précipité jaune pâle qui est recueilli par filtration, lavé, séché et cristallisé dans l'acétate d'éthyle.

Après avoir vérifié par étude chromatographique que le composé isolé est pur, nous avons soumis celui-ci à l'identification.

Les résultats obtenus sont les suivants :

1°) Formule brute $C_{17}\ H_{16}\ N_2\ O_3$

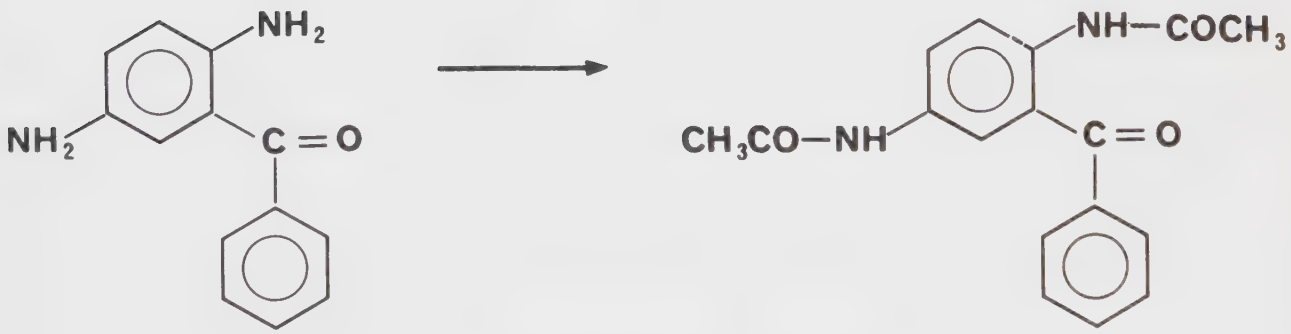
	C	H	N
calculé	68,91	5,40	9,46
trouvé	68,86	5,56	9,48

2°) Spectre de masse.
La masse trouvée expérimentalement (296) correspond à la masse théorique.

3°) Spectre infra-rouge.
Il met en évidence :
3 fonctions carbonyles (1640; 1675 et 1700 cm^{-1});
1 fonction -NH- (3310 cm^{-1}).

Les résultats de l'étude analytique du composé formé sont en parfait accord avec l'hypothèse émise précédemment.

L'acétylation de la diamino-2,5 benzophénone, composé instable, conduit à l'obtention d'un produit stable, la diacétamido-2,5 benzophénone.



IV - APPLICATIONS TOXICOLOGIQUES

41 - *TOXICITE DES DERIVES DE LA BENZODIAZEPINE-1,4 UTILISES EN THERAPEUTIQUE*

Possédant toutes un coefficient thérapeutique élevé (le rapport dose efficace sur dose toxique est voisin de 0,02), les benzodiazépines à propriété psychotrope sont relativement peu toxiques. Lorsqu'elles sont seules responsables d'une intoxication aiguë, on observe souvent une incoordination des mouvements, une ataxie locomotrice, une dysarthrie et une somnolence plus ou moins importante, mais l'état clinique évolue presque toujours favorablement et de façon spontanée *(23)*.

Quant à l'intoxication aiguë par le tétrazépam, elle se caractérise d'abord par une profonde atonie puis par des phénomènes convulsifs.

Si, comme le rappelait récemment BOURDON *(2)*, "les dérivés de la benzodiazépine sont de mauvais toxiques pour des tentatives de suicide", il n'en demeure pas moins qu'ils sont retrouvés dans 10 % environ des intoxications d'étiologie médicamenteuse.

De plus, l'application d'une méthode de recherche systématique des principaux toxiques, comme MEUNIER le préconise *(49)*, fait apparaître, en effet, le caractère mixte des intoxications aiguës volontaires dans 30 à 40 % des cas. Des phénomènes de potentialisation et de synergie interviennent alors et sont responsables d'états cliniques plus graves ou d'évolution favorable plus lente que ne le laisserait prévoir la juxtaposition des troubles qui seraient observés lors d'intoxication aiguë due à chaque composé considéré isolément.

Si la toxicité propre des dérivés de la benzodiazépine semble faible, il n'en demeure pas moins nécessaire de pouvoir rapidement détecter leur présence dans les échantillons de liquides biologiques à analyser.

Ainsi se trouvent posés en toxicologie, et plus particulièrement en Toxicologie Hospitalière d'Urgence, les problèmes analytiques liés à ces molécules.

42 - *PROBLEMES POSES PAR L'ANALYSE TOXICOLOGIQUE HOSPITALIERE D'URGENCE*

Comme le rappelle MEUNIER *(48)* la Toxicologie Hospitalière d'Urgence doit répondre à deux exigences apparemment contradictoires : la précision et la rapidité.

La précision est liée à la mise en oeuvre de méthodes physico-chimiques permettant de mettre en évidence et d'une façon spécifique soit une molécule médicamenteuse, soit le plus souvent une structure chimique fondamentale. C'est la raison pour laquelle il est intéressant de posséder un réactif dit "réactif de groupe". Certes la spécificité recherchée n'est pas toujours atteinte et, souvent, la positivité d'une réaction n'est en faveur que d'une forte présomption de présence du toxique incriminé. Mais la négativité de cette même réaction permet, de façon tout aussi intéressante, de pouvoir affirmer l'absence des dérivés recherchés.

Quant à la rapidité elle ne peut être obtenue que par une organisation rationnelle du travail, la mise en oeuvre de techniques simples et une pratique de cette activité particulière des Laboratoires Hospitaliers.

Le choix du milieu biologique sur lequel seront recherchés, identifiés, voire dosés, les dérivés de la benzodiazépine, est dicté par les impératifs suivants :

A - La quantité de sang dont dispose l'analyste est souvent réduite et outre les recherches toxicologiques, il lui sera demandé de pratiquer des déterminations biochimiques fondamentales (équilibre hydroélectrique, équilibre acido-basique, origine endogène d'un coma toxique...). D'autre part, si la connaissance de la barbitémie, de l'imipraminémie, de la salicylémie sont nécessaires, le taux sanguin de dérivé benzodiazépinique, en particulier lorsque l'absorption n'est pas associée à d'autres toxiques, ne présente qu'un intérêt secondaire.

B - Les données métaboliques exposées au *chapître 13* et les résultats analytiques rapportés précédemment, montrent, qu'après l'absorption de benzodiazépines (à l'exception du

tétrazépam), l'hydrolyse chlorhydrique à chaud de l'ensemble des métabolites présents dans l'urine conduit à l'obtention d'au moins une amine aromatique primaire, qu'il est possible d'identifier par spectrophotométrie d'absorption après diazocopulation. C'est donc une "réaction de groupe" qui permet indirectement, la caractérisation dans les urines des dérivés psychotropes de la benzodiazépine-1,4.

Dans le cas particulier du tétrazépam, un simple examen en lumière de WOOD, permet de mettre en évidence les acridones, formées par hydrolyse chlorhydrique, par leur intense fluorescence et l'identification de ce composé à propriétés myorelaxantes.

C - De l'ensemble de ce qui précède et compte tenu de l'élimination rénale relativement précoce des métabolites notamment N_1-déméthylés, l'urine convient parfaitement pour la recherche des dérivés psychotropes benzodiazépiniques en Toxicologie d'Urgence.

43 - *RECHERCHE DES DERIVES DE LA BENZODIAZEPINE-1,4 DANS LES URINES*

431 - *Principe*

Les formes libres et conjuguées des benzodiazépines et de leurs métabolites présents dans l'urine sont hydrolysées durant 30 minutes au bain-marie bouillant en milieu chlorhydrique environ 4N. Après refroidissement, les composés formés sont extraits par l'éther, qui est lavé, déshydraté puis soumis aux réactions de caractérisation.

432 - *Technique spectrophotométrique après diazocopulation*

4321 - Réactifs

- Solution aqueuse de nitrite de sodium à 0,5 % (extemporanée),
- Solution aqueuse de sulfamate d'ammonium à 2 % (extemporanée).

- Solution aqueuse de chlorhydrate de N-alpha-naphtyl N', N'-diéthylpropylènediamine à 0,1 %. Réactif de TREFOUEL (conservation limitée).

4322 - Protocole opératoire

Dans un erlenmeyer de 250 ml bouchant émeri, mélanger :

Urines ..... 70 ml
HCl (d = 1,18) ..... 40 ml

Placer le récipient dans un bain-marie bouillant durant 30 minutes. Refroidir sous un courant d'eau froide, puis extraire énergiquement durant 3 minutes par 130 ml d'éther (aucun risque d'émulsion).

Après décantation, l'extrait éthéré est lavé :
- deux fois avec 50 ml d'acide chlorhydrique N;
- deux fois avec 50 ml d'eau distillée;

et enfin déshydraté par agitation en présence de sulfate de sodium anhydre.

> Pour éliminer toute trace de sulfamide, après une absorption importante d'un de ces dérivés, nous conseillons une seconde série de lavages.

Après un examen à 366 nm, permettant de mettre en évidence la présence éventuelle d'acridones (intense fluorescence bleue), 50 ml de phase extractive éthérée sont évaporés sous vide en présence de 6 ml de solution aqueuse d'acide chlorhydrique 6 N.
Après évaporation, la phase acide restante est transvasée dans un tube jaugé et son volume est complété à 10 ml avec de l'eau distillée.

La réaction de diazocopulation est effectuée dans les conditions suivantes :

	Tube Témoin	Tube Recherche
Extrait chlorhydrique ...	5 ml	5 ml
Solution de nitrite de sodium à 0,5 %	0,5 ml	0,5 ml

Placer les tubes 5 minutes dans la glace fondante.
Après avoir ramené le contenu des tubes à la température du laboratoire, ajouter dans chacun d'eux 1 ml de solution de sulfamate d'ammonium à 2 %.
Agiter régulièrement durant deux minutes puis ajouter dans chaque tube :

	Tube Témoin	Tube Recherche
Eau distillée	1 ml	0 ml
Réactif de TREFOUEL	0 ml	1 ml

Maintenir les tubes dans un bain-marie à 50° C pendant 15 mn puis mesurer à 540 nm la densité optique de la solution contre la solution témoin.
Lorsque la D.O. est très élevée, il est possible de pratiquer une dilution de la coloration par de l'eau distillée. On opèrera de même sur le témoin.

4323 - Résultats obtenus

Les longueurs d'onde du maximum d'absorption de la coloration développée dans les conditions précédentes par chacune des amines aromatiques primaires dérivées des benzodiazépines sont les suivantes :

- amino-2 chloro-5 benzophénone ..... 541 nm
- amino-2 nitro-5 benzophénone ..... 531 nm
- diamino-2,5 benzophénone ..... 545 nm

La sensibilité est très satisfaisante puisque l'application de la technique précédente, à l'urine d'un malade traité par 50 milligrammes d'oxazépam par jour (diurèse 1,700 litre), conduit, après dilution au 1/5 avec de l'eau distillée de la phase colorée, à une densité optique de 0,582 à 540 nm.

4324 - Spécificité

La réaction de diazocopulation étant une méthode très générale de mise en évidence des amines aromatiques primaires, il nous a paru nécessaire d'envisager les principaux composés médicamenteux qui pourraient conduire, soit directement, soit par l'intermédiaire de leurs métabolites urinaires, à une réaction positive. Les sulfamides, l'acide para-amino-salicylique, l'acétanilide et la phénacétine ne sont pas une cause d'interférence dans la technique préconisée *(37)*.

43241 - Sulfamides

A - Sulfamides antibactériens

En principe, les sulfamides antibactériens sont des dérivés substitués de l'acide para-amino-benzène sulfonique. Ils ne se retrouvent pas dans la solution chlorhydrique finale et n'interfèrent pas dans la recherche colorimétrique des benzodiazépines.

Nous avons vérifié ce fait à partir des urines de sujets ayant absorbé, soit de la sulfaméthoxypiridazine (SULTIRENEND), soit du sulfathiazole (THIAZOMIDEND).

B - Sulfamides hypoglycémiants

Le plus souvent le groupement aminé en para est supprimé de façon à faire disparaître toute propriété antibactérienne au sulfamide hypoglycémiant et, ainsi, d'éviter à la longue une modification de la flore bactérienne intestinale. Ne possédant pas de fonction amine aromatique primaire, ces composés ne peuvent donc interférer.

43242 - Acide para-amino-salicylique

Après l'administration de P.A.S., on trouve notamment dans l'urine le produit inchangé; l'acide N-acétyl para-amino-salicylique et le méta-amino-phénol.

Une réaction de diazocopulation pratiquée directement sur les urines de malades recevant ce médicament conduit à une intense réaction positive.

L'application de la technique précédente (deux lavages de la solution éthérée d'extraction) conduit à une réaction NEGATIVE.

43243 - Acétanilide

L'étude des métabolites urinaires montre la présence d'ortho-amino-phénol et de para-aminophénol diazocopulables, mais qui ne sont extractibles par l'éther qu'à partir de leur solution aqueuse alcaline.

43244 - Aniline

Nous avons vérifié que celle-ci, après lavage de l'éther par la solution acide, ne conduisait pas à une réaction positive avec

la technique préconisée (sauf si très grandes quantités d'aniline qui ne sont pas totalement éliminées par les lavages acides).

43245 - Phénacétine

Nous avons vérifié que la phénacétine dont l'hydrolyse acide conduit à la formation de para-aminophénol, n'était pas une cause d'interférence dans la technique préconisée.

433 - *Technique chromatographique sur couche mince d'adsorbant*

4331 - Réactifs et matériel

- Solution aqueuse extemporanée dans l'acide chlorhydrique 2N, de nitrite de sodium à 1 %.
- Réactif de TREFOUEL [solution aqueuse de chlorhydrate de N-alpha-naphtyl N'-N' diéthylpropylènediamine à 0,1 % (mauvaise conservation)].
- Couche mince d'oxyde d'aluminium F_{254} type E (Merck n° 5713/0025).
- Activation des plaques : une heure à 105° C puis refroidissement sous vide en présence d'actigel.
- Saturation des enceintes durant 15 heures (parois tapissées de papier Arches 304).
- Migration du solvant à partir de la ligne de dépôt : 12 cm.
- Solvant : benzène (Merck n°1783)..... 3 volumes
  chloroforme (Merck n° 2445)... 1 volume.
- Produit de référence : benzophénone (Merck n° 1801).

4332 - Protocole opératoire et résultats obtenus

L'hydrolyse de l'urine, l'extraction par l'éther, le lavage et la déshydratation de l'extrait éthéré sont réalisés dans les mêmes conditions que celles indiquées antérieurement (technique spectrophotométrique après diazocopulation).

50 ml de phase extractive éthérée sont évaporés sous vide. L'extrait obtenu est dissous dans 0,5 à 2 ml d'éthanol absolu dont 10 à 20 microlitres sont soumis à la séparation chromatographique. 0,02 micromole de benzophénone (substance de référence) est déposée afin de pouvoir identifier les composés par leur Rf relatif.

Après migration et séchage de la plaque, on mesure à 254 nm le Rf absolu de chacun des spots, et les composés sont identifiés par la détermination de leur Rf relatif par rapport à la benzophénone. Il est également possible de confirmer l'identité de l'amino-2 chloro-5 benzophénone, de l'amino-2 nitro-5 benzophénone et de la diamino-2,5 benzophénone par diazocopulation directe sur la couche mince d'adsorbant.

Pour cela, on pulvérise la solution aqueuse (dans l'acide chlorhydrique 2N) de nitrite de sodium à 1 % en ayant soin de ne pas trop imprégner la plaque (ce qui entraînerait un décollement de la couche mince d'oxyde d'aluminium). Après un contact de 10 minutes, la plaque est séchée à l'aide d'un courant d'air chaud jusqu'à évaporation de la solution aqueuse acide, ce qui se vérifie aisément par exposition de la plaque à 254 nm.

Le réactif de TREFOUEL est ensuite pulvérisé avec précaution. Les amino-2 benzophénones sont révélées par l'apparition d'une tache violette qui s'intensifie avec le temps ou la chaleur (T = 50° C). Cette réaction est très sensible.

L'association de la valeur du Rf relatif et du caractère diazocopulable de la tache chromatographique permet de mettre en évidence la présence d'un dérivé de l'amino-2 benzophénone provenant de benzodiazépine à propriété psychotrope.

Dans le cas particulier des acridones provenant de l'hydrolyse des métabolites urinaires du tétrazépam, le Rf relatif par rapport à la benzophénone sera confirmé par un simple examen à 366 nm (à pratiquer avant la pulvérisation des réactifs de diazocopulation), longueur d'onde à laquelle les acridones présentent une intense fluorescence jaune-verdâtre. Remarquons enfin que la C.C.M. des produits d'hydrolyse permet, soit l'identification du dérivé absorbé (nitrazépam et tétrazépam), soit son classement dans l'un des deux groupes de molécules à même activité thérapeutique (anxiolytique), ainsi que le montre le tableau suivant.

COMPOSES IDENTIFIES APRES HYDROLYSE DES METABOLITES URINAIRES	PRODUITS ABSORBES	ACTIVITE THERAPEUTIQUE
Amino-2 chloro-5 benzophénone et Méthylamino-2 chloro-5 benzophénone	Diazépam ou Médazépam	Anxiolytique
Amino-2 chloro-5 benzophénone	Chlordiazépoxide Clorazépate ou Oxazépam	Anxiolytique
Amino-2 nitro-5 benzophénone et Diamino-2,5 benzophénone (en quantité variable)	Nitrazépam	Hypnotique
Chloro-7 hexahydroacridone et Méthyl-10 chloro-7 hexahydro-acridone	Tétrazépam	Myorelaxant

434 - *Exemples appliques à la toxicologie hospitalière d'urgence*

Nous rapportons ci-dessous les résultats obtenus dans l'application des techniques précédentes à trois urines de malades hospitalisés et suspects d'intoxication aiguë par les benzodiazépines.

- **Sujet n° 1**

Heure présumée de l'intoxication ..... : 6 h.
Heure du prélèvement urinaire ..... : 11 h.

A - **Etude spectrophotométrique**

D.O. à 540 nm = 1,030
λ max de la coloration = 540 nm

B - **Etude chromatographique sur couche-mince**

Mise en évidence de :
Amino-2 chloro-5 benzophénone
Méthylamino-2 chloro-5 benzophénone.

C - **Conclusions**

Présence de benzodiazépine :
diazépam ou médazépam.

D **Médicament responsable de l'intoxication et quantité absorbée**

Diazépam : 150 milligrammes.

- **Sujet n° 2**

Heure présumée de l'intoxication ... : soirée
Heure du prélèvement urinaire ..... : 8 h.

A - **Etude spectrophotométrique**

D.O. à 540 nm = 0,925
λ max. de la coloration = 540 nm avec un pic mal résolu dont le maximum d'absorption se situe au voisinage de 530 nm.

B - **Etude chromatographique sur couche-mince**

Mise en évidence de :
Amino-2 chloro-5 benzophénone
Méthylamino-2 chloro-5 benzophénone
Amino-2 nitro-5 benzophénone.

C - **Conclusions**

Présence de benzodiazépines :
Nitrazépam et Diazépam ou
Médazépam.

D - **Médicaments responsables de l'intoxication et quantité absorbée**

(Laroxyl : 80 centigrammes; Eunoctal : 2 grammes).
Diazépam ..... : 150 milligrammes.
Nitrazépam ..... : 200 milligrammes.

- **Sujet n° 3**

Heure présumée de l'intoxication ... : 22 h.
Heure du prélèvement urinaire ..... : 6 h. 30

A - **Etude spectrophotométrique**

D.O. à 540 nm = 2,925 (0,585 après dilution au 1/5 avec de l'eau distillée)
λ max. de la coloration = 531 nm.

B - **Etude chromatographique sur couche mince**

Mise en évidence de :
Amino-2 nitro-5 benzophénone.

C - **Conclusions**

Présence de benzodiazépine : Nitrazépam.

D - **Médicaments responsables de l'intoxication et quantité absorbée**

(Méprobamate : dose mal connue).
Nitrazépam ..... : 150 milligrammes (aurait absorbé 30 comprimés).

435 - *Remarques*

Le temps nécessaire à la réalisation des techniques et notamment le temps de l'hydrolyse (30 minutes) semblent apparemment en contradiction avec la rapidité exigée par l'analyse toxicologique hospitalière d'urgence. Mais comme nous l'avons déjà mentionné, cette analyse ne prend sa véritable valeur que si les principaux toxiques les plus fréquemment à l'origine d'intoxications aiguës sont **systématiquement** recherchés.

Dans ces conditions, l'organisation du travail permet d'inclure les techniques précédentes dans l'ensemble des travaux analytiques qui doivent être réalisés dans le cadre d'une urgence toxicologique.

44 - *DOSAGE DES DERIVES DE LA BENZODIAZEPINE-1,4 DANS LES URINES*

Bien que le dosage des dérivés de la benzodiazépine ne présente pas, comme nous l'avons déjà souligné, un intérêt primordial, il peut être réalisé en particulier par chromatographie en phase gazeuse.

441 - *Technique chromatographique en phase gazeuse*

Comme dans la recherche de ces médicaments dans les urines, on effectue une hydrolyse chlorhydrique à 100° C de l'ensemble des dérivés benzodiazépiniques présents dans les urines. L'extraction des produits formés est réalisée par l'éther, qui est ensuite lavé, déshydraté puis évaporé sous vide. Le résidu est repris par une quantité adéquate (fonction de la quantité de composés à doser) de solution éthanolique de diazépam (100 mcg/ml). [Le diazépam sert de substance de référence pour l'identification des pics et d'étalon interne pour l'analyse quantitative].

Les conditions opératoires sont identiques à celles exposées au *chapitre* 323 et il suffit d'appliquer la relation fondamentale :

$$m_X = m_E \cdot \frac{S_X}{S_E} \cdot K'_X$$

Les valeurs des coefficients de proportionnalité relatifs (K'_X) ont été déterminées expérimentalement lors de l'étude théorique.

Des remarques s'imposent :

1° Sauf dans le cas d'absorption de chlordiazépoxide, de clorazépate ou d'oxazépam où seule est présente, après hydrolyse des métabolites urinaires, l'amino-2 chloro-5 benzophénone, nous obtiendrons deux composés.

2° Bien que nous n'ayons pas personnellement observé le phénomène, signalons que GROS et RAVEUX *(24)* ont montré que dans certains échantillons d'urine sont présentes des substances, de nature inconnue, capables de réagir soit avec les benzodiazépines (clorazépate et oxazépam), soit plus vraisemblablement

avec l'amino-2 chloro-5 benzophénone au fur et à mesure de sa formation et qui la transformeraient en un produit de dégradation soit inextractible, soit non chromogène (l'étude ayant été réalisée par spectrophotométrie après diazocopulation).

3° Lorsque les urines soumises à l'analyse sont trop récentes par rapport au moment initial de l'intoxication, la faible quantité de composés présents dans l'échantillon risque de ne pas être mesurable avec un détecteur à ionisation de flamme alors que la méthode spectrophotométrique après diazocopulation très sensible, permet une recherche de ces molécules.
Afin de pouvoir réaliser une détermination quantitative sur un extrait concentré et purifié, nous préconisons d'opérer de la façon suivante.

La phase extractive éthérée, lavée et déshydratée, est évaporée sous vide. Le résidu est repris par 4,4 ml du mélange (benzène: 4 ml; dioxane: 0,4 ml). La solution est versée au sommet d'une colonne de verre (longueur 15 cm, diamètre intérieur 1 cm) remplie sur 10 cm de hauteur de florisil imprégné de benzène. L'élution est réalisée au moyen de 30 ml. du mélange (benzène - dioxane : 98/2) qui est ensuite évaporé sous vide.
Le résidu est repris par une quantité adéquate de solution éthanolique de diazépam (100 mcg/ml) et l'on pratique la détermination quantitative par C.P.G. dans les mêmes conditions que celles exposées antérieurement.

Le rendement d'élution pour les produits d'hydrolyse est compris entre 95 et 100 % sauf pour l'amino-2 nitro-5 benzophénone où il n'est que de 82 %.

442 - *Cas particulier du Tétrazépam*

Les produits obtenus par hydrolyse chlorhydrique des métabolites urinaires du tétrazépam, présentent une intense fluorescence par excitation en lumière de WOOD.

Dans ce cas particulier, outre un dosage chromatographique en phase gazeuse, il est possible de réaliser une évaluation quantitative par spectrofluorimétrie en opérant dans les conditions suivantes :

- l'hydrolyse des métabolites urinaires du tétrazépam et l'extraction des acridones formées sont réalisées comme il est indiqué au chapitre 4322. 50 millilitres de phase extractive éthérée sont évaporés sous vide et le résidu est dissous dans 10 millilitres d'alcool éthylique anhydre (CARLO ERBA R.P. A.C.S.). La solution éthanolique est ensuite soumise après dilution éventuelle avec de l'éthanol, à l'analyse spectrofluorimétrique (excitation = 413 nm; émission = 516 nm; zéro sur l'alcool éthylique anhydre).

On se reporte à une courbe de référence, établie par dilutions successives dans l'alcool éthylique d'une solution éthanolique $4 \cdot 10^{-5}$ M de chloro-7 méthyl-10 hexahydro-1,2,3,4,4a,9a acridone.

L'ensemble des composés fluorescents obtenus par hydrolyse des métabolites urinaires du tétrazépam est alors exprimé en acridone N-substituée. En multipliant la quantité d'acridone trouvée par 1,15 on peut avoir une idée approximative de la quantité des métabolites du tétrazépam présents dans les urines et par conséquent de la quantité ingérée sachant que l'élimination est lente et ne représente au maximum en 24 heures que 5 % de la quantité absorbée.

CONCLUSIONS

A - L'introduction en thérapeutique de deux nouveaux dérivés de la benzo-(f)-diazépine-1,4, le médazépam et le tétrazépam, nous a conduit à entreprendre une étude analytique complète de ces deux composés et à soumettre les dérivés antérieurement utilisés (ainsi que certains de leurs métabolites et leurs produits d'hydrolyse acide) aux techniques analytiques nouvelles :

- Chromatographie sur couche mince d'oxyde d'aluminium en utilisant comme solvant :

  . le mélange (chloroforme-éthanol : 29/1)
  pour les benzodiazépines et leurs métabolites;

  . le mélange (benzéne-chloroforme : 3/1)
  pour leurs produits d'hydrolyse.

- Chromatographie gaz-liquide en utilisant une phase stationnaire d'OV 17 (3 % sur gas-chrom Q), la séparation étant réalisée à 250° C pour les benzodiazépines et leurs métabolites et à 210° C pour les produits d'hydrolyse.

Les deux composés, leur dérivé N_1-déméthylé, l'ensemble des benzodiazépines et leurs principaux métabolites ont été en outre soumis à l'analyse par spectrophotométrie d'absorption dans l'ultra-violet et à l'analyse spectrofluorimétrique.

B - Le médazépam, le tétrazépam et leur dérivé N_1-déméthylé ont été soumis à l'action de l'acide chlorhydrique à 100° C qui conduit pour les dérivés antérieurement décrits (benzodiazépines et métabolites) à la formation d'amines aromatiques primaires et secondaires.

1° - Le tétrazépam et le tétrazépam N_1-déméthylé ne conduisent pas dans ces conditions à la formation d'amines aromatiques (secondaire et primaire).

a) L'analyse élémentaire, la spectroscopie d'absorption dans l'infra-rouge, la spectrométrie de résonance magnétique nucléaire et la spectrométrie de masse ont permis l'identification :

- de la chloro-7 N méthyl-10 hexahydro-1,2,3,4,4a,9a acridone formée à partir du tétrazépam;
- de la chloro-7 hexahydro-1,2,3,4,4a,9a acridone formée à partir du tétrazépam N_1-déméthylé.

Ces dérivés de l'acridone résultent respectivement de la cyclisation intramoléculaire de la méthylamino-2 chloro-5 benzoylcyclohexène-1'yl et de l'amino-2 chloro-5 benzoylcyclohexène-1'yl.

La structure de la chloro-7 hexahydro-1,2,3,4,4a,9a acridone a été, en outre, confirmée par la préparation et l'analyse de son dérivé N-acétylé.

b) En fonction de la concentration en acide chlorhydrique du milieu réactionnel, le tétrazépam conduit à la formation de trois composés dont les deux plus importants ont été isolés, purifiés et analysés. Il s'agit des isomères cis et trans de jonction de deux cycles de la chloro-7 N méthyl-10 hexahydro-1,2,3,4,4a,9a acridone.

2° - L'action de l'acide chlorhydrique à 100° C sur le médazépam ne conduit pas à la formation d'une amine aromatique secondaire (méthylamino-2 chloro-5 benzophénone). Le composé obtenu a été séparé, purifié et analysé.

a) L'analyse élémentaire et la spectroscopie d'absorption dans l'infra-rouge ont permis : d'identifier la dichloro-5,7 dihydro 2, 3 méthyl-1 phényl-5 benzo-(f)- 1 H diazépine - 1,4 (résultant de l'addition d'une molécule d'acide chlorhydrique sur la double liaison N_4-C_5), sous forme de chlorhydrate.

b) L'action de l'anhydride acétique sur le composé d'addition formé, conduit à l'obtention d'un produit qui a été séparé, purifié et analysé. L'analyse élémentaire, la spectroscopie d'absorption dans l'infra-rouge, la spectrométrie de résonance magnétique nucléaire et la spectrométrie de masse ont permis l'identification de :

N [(benzoyl-2 chloro-5 N-méthylanilino)-2 éthyl] acétamide.

C - L'étude métabolique du médazépam effectuée par d'autres auteurs ayant montré, notamment, la possibilité de l'oxydation du carbone 2 du cycle diazépinique et de la N_1-déméthylation, l'action de l'acide chlorhydrique sur l'ensemble des métabolites éliminés par les urines au cours d'une absorption de médazépam doit conduire à la formation d'un mélange d'amines aromatiques secondaire et primaire (méthylamino-2 chloro-5 benzophénone et amino-2 chloro-5 benzophénone).

Leur formation, après action de l'acide chlorhydrique sur les urines recueillies après absorption de médazépam a été mise en évidence :

- par diazocopulation de la fonction amine primaire de l'amino-2 chloro-5 benzophénone;
- par chromatographie sur couche mince d'adsorbant (l'amino-2 chloro-5 benzophénone et la méthylamino-2 chloro-5 benzophénone).

D - La diamino-2,5 benzophénone obtenue par hydrolyse chlorhydrique du nitrazépam réduit (métabolite identifié) est très altérable. L'action de l'anhydride acétique conduit à la formation d'un composé dont l'analyse élémentaire et l'étude par spectroscopie d'absorption dans l'infra-rouge et par spectrométrie de masse ont permis l'identification : la diacétamido-2,5 benzophénone, dont la grande stabilité permet, son utilisation comme témoin lors d'une étude métabolique du nitrazépam.

E - L'étude métabolique des benzodiazépines-1,4 à propriété psychotrope montre, qu'après l'absorption d'un quelconque de ces composés, il est possible d'obtenir après hydrolyse chlorhydrique de l'ensemble de ses métabolites présents dans les urines, au moins une amine aromatique primaire diazocopulable.

Par contre le tétrazépam dérivé non psychotrope ne conduit pas à l'obtention d'amine aromatique primaire mais à la formation d'acridones qui présentent une intense fluorescence par excitation à 366 nm.

F - En toxicologie hospitalière d'urgence.

- La réaction de diazocopulation, pratiquée après hydrolyse de l'ensemble des métabolites urinaires des benzodiazépines psychotropes et après la séparation adéquate des amines formées, permet de caractériser indirectement, mais avec une grande certitude ces molécules et leurs métabolites dans les urines.

La détermination de la longueur d'onde du maximum d'absorption de la coloration permet d'aider à l'identification indirecte du nitrazépam (hypnotique) et de le différencier des benzodiazépines anxiolytiques.

- L'examen spectrofluorimétrique des acridones obtenues dans les mêmes conditions, permet d'apporter un élément de présomption de présence de métabolites urinaires du tétrazépam (myorelaxant).

- La chromatographie sur couche mince d'adsorbant des produits d'hydrolyse de l'ensemble des métabolites urinaires des benzodiazépines permet, après examen à 366 nm et réaction de diazocopulation sur la chromatoplaque, soit l'identification du dérivé absorbé (nitrazépam et tétrazépam), soit son classement dans l'un des deux groupes de molécules à même activité thérapeutique (anxiolytique).

Quelques exemples de résultats obtenus dans l'application des techniques précédentes aux urines de malades hospitalisés et suspects d'intoxication aiguë par les benzodiazépines - 1,4 sont rapportés.

BIBLIOGRAPHIE

1 - ARIZAN (S.), SIMIONOVICI (R.), VOINOV (V.)
Nachweis und Bestimmumg von Zwischenprodukten bei der Synthese von Diazepam.
PHARMACIE DTSCH. 1969, 24, 746-748.

2 - BADINAND (A.), BOURDON (R.), PHILIBERT (H.), PICARD (P.), PAQUET (R.), MASBERNARD (A.), MEUNIER (J.)
Table Ronde consacrée à la Toxicologie Hospitalière d'Urgence.
BULL. SOC. MED. CHIR. HOP. FORM. SAN. ARMEES. 1970, 5, 393-424.

3 - BARTOSEK (I.), KVETINA (J.), GUAITINI (A.), GARATTINI (S.)
Comparative study of nitrazepam metabolism in perfused isolated liver of laboratory animals.
EUROP. J. PHARMACOL., 1970, 11, 378-382.

4 - BARTOSEK (I.), MUSSINI (E.), SARONIO (C.), GARATTINI (S.)
Studies on nitrazepam reduction in vitro.
EUROP. J. PHARMACOL., 1970, 11, 249-253.

5 - BAUMLER (J.), RIPPSTEIN (S.)
Über den nachweiss von "Methaminodiazepoxid" (librium) und seiner metaboliten.
HEL. CHIM. ACTA., 1961, 44, 2208-2210.

6 - BELLOMONTE (G.)
Determinazione del Diazepam e Suor Metaboliti nei liquidi biologici.
BOLL. SOC. ITAL. BIOL. SPER., 1967, 43, 460-464.

7 - BEYER (K.H.), SADEE (W.)
Synthese und Analytik möglicher Nitrazepam-Metaboliten.
ARCH. PHARM. (WEINHEIM), 1969, 302, 152-157.

8 - BEYER (K.H.), SADEE (W.)
Analytische Daten von vier 5 - Phenyl -1,4 Benzodiazepinderivaten in Monographien.
DEUT. APOTH. ZTG., 1969, 109, 312-314.

9 - BEYER (K.H.), SADEE (W.)
Spektrophotometrische Bestimmumg von 5-phenyl-1,4 Benzodiazepin-Derivaten und Untersuchungen über den Metabolismus des Nitrazepams. V. Mitteilung zur Chemie und Analytik von Benzodiazepin-Derivaten.
ARZNEIMITT. FORSCH., 1969, 19, 1929-1931.

10 - BLEY (W.), NUHN (P.), BENNDORF (G.)
NMR-Specktrokopische Untersuchung von Arzneimitteln. 2 mitt. Zur Konformation und Ringinversion von Diazepam, Nitrazepam und Chlordiazepoxide.
ARCH. PHARM:, 1968, 301, 444-451.

11 - BRAUN (J.), CAILLE (G.), MARTIN (E.A.)
Etude de la fluorescence de quelques dérivés de la 1,4 benzodiazépine.
CAN. J. PHARM. SCI. 1968, 3, 65-68.

12 - CAILLE (G.), BRAUN (J.), MOCKLE (J.A.)
Analyses spectrofluorimétrique et polarographique des formes pharmaceutiques renfermant des dérivés de la 1,4 benzodiazépine.
CAN. J. PHARM. SCI. 1970, 5, 78-80.

13 - CANO (J.P.), VIGNOLI (L.), VIALA (A.)
Détermination du diazépam dans le sang et l'urine par chromatographie en phase gazeuse. 1 - Matériel et méthode.
ANN. PHARM. FRANC. 1967, 25, 697-703.

14 - CANO (J.P.), VIGNOLI (L.), VIALA (A.)
Détermination du diazépam dans le sang et l'urine par chromatographie en phase gazeuse. 2 - Applications pharmacologiques et toxicologiques.
ANN. PHARM. FRANC., 1967, 25, 821-828.

15 - CLIN-BYLA (Laboratoires)
Estimation du 4306 CB (clorazépate) et de ses métabolites dans le sang.
Département chimie biologique et analytique (communication personnelle).

16 - CLIN-BYLA (Laboratoires)
Perspectives sur le métabolisme et l'excrétion du tétrazépam (4261 CB).
Document du Centre de Recherche CLIN-BYLA.

17 - DURISINOVA (L.), BELLUS (D.)
Thin layer chromatography of 2-hydroxybenzophenones.
J. CHROMATOGR. 1968, 32, 584-587.

18 - EICH (E.), GEISSLER (H.), MUTSCHLER (E.), SCHUNACK (W.)
Die direkte quantitative Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen durch Remissions-und Fluoreszenzmessungen.
ARZNEIMITT. FORSCH. 1969, 19, 1895-1897

19 - FABIANI (P.), FROSSARD (C.), DUPEYRON (J.P.), BASTIEN (C.)
Diagnose rapide de quelques intoxications courantes.
ANN. BIOL. CLIN. 1969, 27, 105-114.

20 - FAZZARI (F.R.), RIGGEMAN (O.H.)
Polarographic Determination of Oxazepam.
J. PHARM. SCI. 1969, 58, 1530-1531.

21 - FAZZARI (F.R.), SHARKEY (M.F.), YACIW (C.A.), BRANNON (W.L.)
Infrared and ultraviolet spectra of some pharmaceutical compounds.
JOURNAL OF THE A.O.A.C. 1968, 51, 1154-1167.

22 - FOSTER (L.B.), FRINGS (C.S.)
Determination of Diazepam (Valium). Concentrations in Serum by gas-liquid. Chromatography.
CLIN. CHEM. 1970, 16, 177-179.

23 - FREJAVILLE (J.P.)
Identification et métabolisme des benzodiazépines.
Revue générale à propos de cent dix-huit cas d'intoxication aiguë.
J. EUROP. TOXICOL. 1969, 2, 239-245.

24 - GROS (P.), RAVEUX (R.)
Etude de l'excrétion du clorazépate dipotassique et de ses métabolites urinaires. Fractionnement. Identification et dosage des métabolites urinaires.
Communication personnelle parue dans Chimie Thérapeutique 1969, 4.

25 - HERMANS (R.B.), KAMP (P.E.)
A scheme for the identification of sedatives and some psychotherapeutics in toxicological analysis.
PHARM. WEEKBLAD. 1967, 102, 1123-1141.

26 - JOMMI (G.), MANITTO (P.), SILANOS (M.A.)
Metabolism of diazepam in rabbits.
ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS. 1964, 108, 334-340.

27 - JOMMI (G.), MANITTO (P.), SILANOS (M.A.)
Metabolism of diazepam in rabbits.
ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS. 1964, 108, 562-568.

28 - KAMM (G.), BAIER (R.)
Nachweiss von Chlordiazepoxid und Diazepam in kleinen Blutmengen.
ARZNEIMITT. FORSCH. 1969, 19, 213-215.

29 - KAMM (G.), KELM (R.)
Quantitatives Nachweiss von 7-chloro-1,3-dihydro-3-hydroxy-5-phenyl-2 H- 1,4 benzodiazepin-2-on im Plasma bei einmaliger und längerer Verabreichung.
ARZNEIMITT. FORSCH. 1969, 19, 1659-1662.

30 - KAPISINSKA (V.), HOLCIK (J.), MOKROSOVA (E.), KOVAC (S.)
Bromatometric determination of benzophenones.
CHEM. PRUM. 1969, 19, 119-120.

31 - KAPLAN (S.A.), LEWIS (M.), SCHWARTZ (M.A.), POSTMA (E.), COTLER (S.), ABRUZZO (C.W.), LEE (T.L.), WEINFELD (R.E.)
Pharmacokinetic model for chlordiazepoxide. HCl in the dog.
J. PHARM. SCI. 1970, 59, 1569-1574

32 - KLEIJN (E.) Van der
Kinetics of distribution and metabolism of diazepam and chlordiazepoxide in mice.
ARCH. INT. PHARMACODYN. 1969, 178, 193-215.

33 - KLEIJN (E.) Van der
Kinetics of distribution and metabolism of diazepam in animals and humans.
ARCH. INT. PHARMACODYN. 1969, 182, 433-436.

34 - KOECHLIN (B.A.), D'ARCONTE (L.)
Communication personnelle non publiée selon
CANO (J.P.), VIGNOLI (L.), VIALA (A.)
ANN. PHARM. FRANC. 1967, 25, 821-828.

35 - KOECHLIN (B.A.), D'ARCONTE (L.)
Determination of chlordiazepoxide (Librium) and of a metabolite of lactam character in plasma of humans, dogs and rats by a specific spectrofluorimetric micromethod.
ANAL. BIOCHEM. 1963, 5, 195-207.

36 - KOECHLIN (B.A.), SCHWARTZ (M.A.), KROL (G.), OBERHANSLI (W.)
The metabolic fate of C^{14} labelled chlordiazepoxide in man, in the dog and in the rat.
PHARM. EXP. THER. 1965, 148, 399-411.

37 - LAFARGUE (P.), MEUNIER (J.), LEMONTEY (Y.)
Mise en évidence rapide dans les urines de quelques dérivés de la benzo-(f)-diazépine - 1,4.
ANN. FALS. EXP. CHIM. *(à paraître).*

38 - LAFARGUE (P.), MEUNIER (J.), PUSSET (J.), LEMONTEY (Y.)
Etude de la réaction d'hydrolyse acide d'un dérivé de la tétrahydro-2,3 phényl-5 benzo-(f)-diazépine-1,4.
C.R. ACAD. SC. PARIS, 1971 - Série C, 273, 375-377.

39 - LAFARGUE (P.), MORINIERE (J.L.), PONT (P), MEUNIER (J.)
Obtention d'acridones hexahydrogénées par hydrolyse des dérivés cyclohexéniques de benzodiazépines-1,4.
C.R. ACAD. SC. PARIS, 1970, 270, SERIE C, 1186-1188.

40 - LAFARGUE (P.), PONT (P.), MEUNIER (J.)
Etude des dérivés de la benzo-(f)-diazépine-1,4 utilisés en thérapeutique. I - Etude spectroscopique et par chromatographie en couche mince de ces dérivés, de leurs principaux métabolites et des composés formés par leur hydrolyse acide.
ANN. PHARM. FRANC. 1970, 28, 343-354.

41 - LAFARGUE (P.), PONT (P.), MEUNIER (J.)
Etude des dérivés de la benzo-(f)-diazépine-1,4 utilisés en thérapeutique. II - Identification et dosage par chromatographie en phase gazeuse des dérivés de la benzo-(f)-diazépine-1,4, de leurs principaux métabolites et des composés formés par leur hydrolyse acide.
ANN. PHARM. FRANC. 1970, 28, 477-486.

42 - LANGNER (H.J.)
Ein Nachweiss von (RO 5-2807), einem neuem Psychopharmakon aus der Benzodiazepinreihe.
Z. ANAL. CHEM. 1964, 202, 28-34.

43 - LAUFFER (S.), SCHMID (E.)
Dünnschitchromatographisch - spektrophotofluorometrische Bestimmung von 7-chlor-2,3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-1H-1,4 benzodiazepin (medazepam).
ARZNEIMITT. FORSCH. 1969, 19, 740-741.

44 - LEMONTEY (Y.), MEUNIER (J.), LAFARGUE (P.)
Recherche, identification et dosage en toxicologie d'urgence des 5H-dibenzo-(b,f)-azépines dans les milieux biologiques.
CLIN. CHIM. ACTA. 1970, 30, 713-719.

45 - MAC-MARTIN (C.), STREET (H.V.)
Gas-liquid chromatography of submicrogram amounts of drug.
J. CHROMATOG. 1966, 22, 274-285.

46 - MARCUCCI (F.), FANELLI (R.), MUSSINI (E.)
A method for gas chromatographic determination of Benzodiazepines.
J. CHROMATOG. 1968, 37, 318-320.

47 - MARCUCCI (F.), FANELLI (R.), MUSSINI (E.), GARATINI (S.)
Further studies on species difference in diazepam metabolism.
EUROP. J. PHARMACOL. 1970, 9, 253-256.

48 - MEUNIER (J.)
Etude de la formation d'espèces moléculaires transitoires de la phénothiazine et de ses dérivés à usage thérapeutique. Applications analytiques et toxicologiques.
Doctorat en Pharmacie (Etat). Université de PARIS. 1970, N° 221, 138 pages.

49 - MEUNIER (J.), VACCON (L.), HUGNY (D.), LAFARGUE (P.)
Activité du département de toxicologie hospitalière d'urgence du laboratoire de Biochimie Clinique du Val-de-Grâce au cours de l'année 1969.
BULL. SOC. MED. CHIR. HOP. FORM. SAN. ARMEES. 1970, 2, 253-256.

50 - OELSCHLAGER (H.), OEHR (H.P.)
Polarographische Bestimmumg des Medazepams (Nobrium). XII - Mitteilung über Arzneimittelanalysen mittels Polarographie oder Oszillopolarographie.
PHARM. ACTA. HELV. 1970, 45, 708-716.

51 - OELSCHLAGER (H.), VOLKE (J.)
Polarography of therapeutically important -1,4 benzodiazepine derivatives.
SCI. PHARM. PROC. 1965, 2, 101-104.

52 - OELSCHLAGER (H.), VOLKE (J.), KUREK (E.)
Polarographische Gehaltsbestimmumg des Diazepams.
3 mitt. Arzneimittelanalysen mittels Polarographie oder Oszillopolarographie.
ARCH. PHARM. 1964, 297, 431-442.

53 - OELSCHLAGER (H.), VOLKE (J.), LIM (G.T.), FRANK (V.)
Zur Analytik des Euhypnicums 1,3-dihydro-7-nitro-5-phenyl 2H-1,4-benzodiazepin-2-on.
ARZNEIMITT. FORSCH. 1966, 16, 82-87.

54 - PAULUS (W.), HOCH (W.), KEYMER (R.)
Dünnschichtchromatographische Untersuchungen einiger Phenothiazine und ähnlich wirkender Stoffe.
ARZNEIMITT. FORSCH. 1963, 13, 609-610.

55 - PELZER (H.)
Pharmakokinetik und Metabolismus von 7-chlor-1,3-dihydro-3-hydroxy-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on und dessen Hemisuccinat beim Menschen.
ARZNEIMITT. FORSCH. 1969, 19, 1652-1656.

56 - PRIBILLA (O.)
Chlordiazepoxyd.
Studien zum Nachweiss des Ausscheidung beim Menschen.
ARZNEIMITT. FORSCH. 1964, 14, 723-733.

57 - PRIBILLA (O.)
Zum chemischen Nachweis von 1,3-dihydro-7-nitro-5-phenyl-2H-1,4 benzodiazepin-2-on.
ARZNEIMITT. FORSCH. 1965, 15, 1148-1151.

58 - RANDALL (L.O.)
Pharmacology of chlordiazepoxide (librium).
DISEASES NERVOUS SYSTEM. 1961, 22, suppl. 7, 1.

59 - RANDALL (L.O.), SCHECKEL (C.L.), POOL (W.)
Pharmacology of Medazepam and Metabolites.
ARCH. INT. PHARMACODYN., 1970, 185, 135-148.

60 - RIEDER (J.)
Methoden zur Bestimmung von 1,3 Dihydro-7-nitro-5-phenyl-2H-1,4-Benzodiazepin-2-on und seinen Hauptmetaboliten in Biologischen Proben und Ergebnisse von Versuchen über die Pharmakokinetik und den Metabolismus dieser Substanz bei Mensch und Ratte.
ARZNEIMITT. FORSCH. 1965, 15, 1134-1152.

61 - RIEDER (J.), RENTSCH (G.)
Metabolismus und Pharmakokinetik des neuen Psychopharmakons 7-chlor-2,3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-1H-1,4-benzodiazepin (RO 5 . 4556) beim Menschen.
ARZNEIMITT. FORSCH. 1968, 18, 1545-1556.

62 - ROCHE (Laboratoires)
LIBRIUM - "ROCHE". NOTES DE LABORATOIRE.

63 - ROCHE (Laboratoires)
Dosage du Valium dans les milieux biologiques. NOTES DE LABORATOIRE.

64 - RUELIUS (H.W.), LEE (J.M.), ALBURN (H.E.)
Metabolism of Diazepam in Dogs : Transformation to Oxazepam.
ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS. 1965, 111, 376-380.

65 - SALIM (E.F.), DEUBLE (J.L.), PAPARIELLO (G.)
Qualitative and quantitative tests for oxazepam.
J. PHARM. SCI. 1968, 57, 311-313.

66 - SCHMITT (J.), COMOY (P.), SUQUET (M.), BOITARD (J.), LE MEUR (J.), BASSELIER (J.J.), BRUNAUD (M.), SALLE (J.)
Sur un nouveau myorelaxant de la classe des benzodiazépines : le tétrazépam.
BULL. CHIM. THERAP. 1967, 4, 254-259.

67 - SCHMITT (J.), COMOY (P.), SUQUET (M.), CALLET (G.), LE MEUR (J.), BRUNAUD (M.), MERCIER (J.), SALLE (J.), SIOU (G.)
Sur de nouvelles benzodiazépines hydrosolubles douées d'une puissante activité sur le système nerveux central.
BULL. CHIM. THERAP. 1969, 4, 239-245.

68 - SCHWARTZ (M.A.), KOECHLIN (B.A.), POSTMA (E.), PALMER (S.), KROL (G.)
Metabolism of diazepam in rat, dog and man.
J. PHARM. EXP. THER. 1965, 149, 423-435.

69 - SCHWARTZ (M.A.), POSTMA (E.)
Metabolic N-demethylation of chlordiazepoxide.
J. PHARM. SCI. 1966, 55, 1358-1362.

70 - SCHWARTZ (M.A.), POSTMA (E.), KOLIS (S.J.)
Metabolism of demoxepam, a chlordiazepoxide metabolite, in the dog.
J. PHARM. SCI. 1971, 60, 438-444.

71 - SENKOWSKY (B.Z.), LEVIN (M.S.), URBIGKIT (J.R.), WOLLISH (E.G.)
Polarography of some benzodiazepines.
ANAL. CHEM. 1964, 36, 1991-1994.

72 - SHARKEY (M.F.), ANDRES (C.N.), SNOW (S.W.), MAJOR (A.), KRAM (T.), WARNER (V.), ALEXANDER (T.G.)
An index of electronic spectra.
JOURNAL OF THE A.O.A.C. 1968, 51, 1124-1154.

73 - SILVA (J.A.F. de), KOECHLIN (B.A.), BADER (G.)
Blood level distribution patterns of diazepam and its major metabolite in man.
J. PHARM. SCI. 1966, 55, 692-702.

74 - SILVA (J.A.F. de), PUGLISI (C.V.)
Determination of medazepam (nobrium), diazepam (valium) and their major biotransformation products in blood and urine by electron capture gas-liquid chromatography.
ANAL. CHEM. 1970, 42, 1725-1736.

75 - SILVA (J.A.F. de), SCHWARTZ (M.A.), STEFANOVIC (J.), KAPLAN (J.), D'ARCONTE (L.)
Determination of diazepam in blood by gas-liquid chromatography.
ANAL. CHEM. 1964, 36, 2099-2105.

76 - STEIDINGER (J.), SCHMID (E.)
Untersuchungen über den Stoffwechsel von 7-chlor-1,3-dihydro-3-hydroxy-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on.
ARZNEIMITT. FORSCH. 1970, 20, 1232-1235.

77 - STERNBACH (L.H.), KOECHLIN (B.A.), REEDER (E.)
Quinazolines and 1,4 benzodiazepines.
The photoisomerisation of 7-chloro-2-methylamino-5-phenyl-3H-1,4-benzodiazepine-4-oxyde.
J. ORG. CHEM. 1962, 27, 4671-4672.

78 - TOMPSETT (S.L.)
Nitrazepam (mogadon) in blood serum and librium in urine.
J. CLIN. PATHOL. 1968, 21, 366-371.

79 - VIALA (A.), CANO (J.P.)
Teneurs sanguines en diazépam (valium) après administration du médicament sous forme de gouttes ou de sirop.
THERAPIE. 1969, 24, 1115-1121.

80 - WALKENSTEIN (S.S.), WISER (R.), GUDMUNSEN (C.H.), KIMMEL (H.B.), CORRADINO (R.A.)
Absorption, metabolism, and excretion of Oxazepam and its Succinate half-ester.
J. PHARM. SCI. 1964, 53, 1181-1186.

81 - WEIST (F.), SCHMID (E.)
Dünnschichtchromatographischer Schnellnachweis von Tranquilizern der Benzodiazepin-Reihe und von thymoleptischen Medikamenten.
MED. WELT. DTSCH. 1969, 7, 369-372.

TABLE DES MATIERES

PAGE

Introduction 1

I - GENERALITES 3
11 - Benzo-(f)-diazépines-1,4 utilisées en thérapeutique 3
12 - Propriétés pharmacodynamiques 6
13 - Rappels concernant le métabolisme des benzo-(f)-diazépines-1,4 7

II - RAPPEL DES METHODES DEJA UTILISEES POUR L'ETUDE DES BENZODIAZEPINES-1,4 19
21 - Généralités 19
22 - Etude qualitative 19
221 - Benzodiazépines et métabolites 19
2211 - Spectrophotométrie d'absorption dans l'Ultra-Violet 19
2212 - Chromatographie sur couche-mince d'adsorbant (C.C.M.) 21
2213 - Chromatographie en phase gazeuse (C.P.G.) 21
2214 - Spectrophotométrie d'absorption après diazocopulation 24
2215 - Spectrofluorimétrie 25
2216 - Méthodes diverses 26
222 - Produits obtenus par hydrolyse acide 27
2221 - Spectrophotométrie d'absorption dans l'Ultra-Violet 29
2222 - Chromatographie sur couche-mince d'adsorbant 29
2223 - Chromatographie en phase gazeuse 31
2224 - Spectrophotométrie d'absorption après diazocopulation 31
2225 - Méthodes diverses 32

23 - Etude quantitative 33
231 - Chromatographie en phase gazeuse 33
232 - Spectrofluorimétrie 34
233 - Spectrophotométrie d'absorption après diazocopulation 34
234 - Méthodes diverses 35

III - PARTIE EXPERIMENTALE 37
31 - But du travail 37
32 - Choix de techniques analytiques et protocoles opératoires 38
321 - Spectrophotométrie d'absorption dans l'Ultra-Violet 38
3211 - Réactifs 38
3212 - Protocole opératoire 38
322 - Chromatographie sur couche-mince d'adsorbant 39
323 - Chromatographie en phase gazeuse 40
3231 - Etude qualitative 41
3232 - Etude quantitative 41
324 - Spectrofluorimétrie 42
3241 - Réactifs 42
3242 - Protocole opératoire 42
325 - Spectrophotométrie d'absorption dans le visible après diazocopulation 43
3251 - Réactifs 43
3252 - Protocole opératoire 43
33 - Etude analytique du tétrazépam 44
331 - Etude analytique du tétrazépam et de son dérivé N_1 déméthylé 44
332 - Etude analytique des composés obtenus par hydrolyse chlorhydrique du tétrazépam et de son dérivé N_1-déméthylé 44
3321 - Rappel concernant les composés obtenus par hydrolyse des dérivés de la phényl-5 benzo-(f)-diazépine-1,4 44
3322 - Composé obtenu par hydrolyse chlorhydrique du tétrazépam N_1-déméthylé 46

33221 - Hypothèse concernant la nature du composé formé 46
33222 - Conditions opératoires 47
33223 - Identification et structure du composé obtenu 48
3323 - Composé obtenu par hydrolyse chlorhydrique du tétrazépam 51
33231 - Conditions opératoires 51
33232 - Identification et structure du composé obtenu 53
3324 - Etude analytique des acridones obtenues par traitement chlorhydrique du tétrazépam et de son dérivé N_1-déméthylé 55
333 - Nature du composé obtenu par acétylation de la chloro-7 hexahydro-1,2,3,4,4a,9a acridone 55
3331 - Conditions opératoires 55
3332 - Identification et structure du composé obtenu 57
334 - Nature du second composé obtenu par hydrolyse acide du tétrazépam 58
3341 - Hypothèse concernant la nature du composé 58
3342 - Conditions opératoires 59
3343 - Identification et structure du composé 59
34 - Etude analytique du médazépam 61
341 - Etude analytique du médazépam et de son dérivé N_1-déméthylé 61
342 - Etude ahalytique des composés obtenus par traitement chlorhydrique à chaud du médazépam et de son dérivé N_1-déméthylé 61
3421 - Hypothèse concernant la nature des composés formés 61
3422 - Conditions opératoires 62
3423 - Identification et structure des composés obtenus 62

34231 - Cas du médazépam N_1-déméthylé 62
34232 - Cas du médazépam 63
3424 - Etude analytique des composés obtenus par traitement chlorhydrique du médazépam et de son dérivé N_1-déméthylé 64
343 - Nature du composé obtenu par acétylation du dichlorhydrate de dichloro-5,7 dihydro-2,3 méthyl-1 phényl-5 benzo-(f)-1 H diazépine-1,4 65
3431 - Conditions opératoires 65
3432 - Identification et structure du composé obtenu 67
35 - Application des techniques analytiques mises au point à l'ensemble des benzodiazépines-1,4 utilisées en thérapeutique 68
351 - Benzodiazépines et métabolites 68
3511 - Résultats obtenus 69
35111 - Spectrophotométrie d'absorption dans l'Ultra-Violet 69
35112 - Chromatographie sur couche-mince d'adsorbant 69
35113 - Chromatographie en phase gazeuse 69
35114 - Spectrofluorimétrie 77
35115 - Spectrophotométrie d'absorption dans le visible après diazocopulation 80
352 - Composés obtenus par traitement chlorhydrique à chaud des benzodiazépines et de leurs métabolites 81
3521 - Rappel concernant la nature chimique des composés obtenus par hydrolyse chlorhydrique du chlordiazépoxide, clorazépate, diazépam et nitrazépam 81
3522 - Préparation des produits d'hydrolyse 81
35221 - Amino-2 chloro-5 benzophénone 81
35222 - Méthylamino-2 chloro-5 benzophénone 82

35223 - Amino-2 nitro-5 benzophénone ... 82
35224 - Diamino-2,5 benzophénone ... 83
35225 - Chloro-7 hexahydro-1,2,3,4,4a,9a acridone ... 83
35226 - Chloro-7 N-méthyl-10 hexahydro-1,2,3,4,4a,9a acridone ... 84
35227 - Dichlorhydrate de dichloro-5,7 dihydro-2,3 méthyl-1 phényl-5 benzo-(f)-1 H diazépine-1,4 ... 84
35228 - Dichlorhydrate de dichloro-5,7 dihydro-2,3 phényl-5 benzo-(f)-1 H diazépine-1,4 ... 84
3523 - Comportement analytique des produits d'hydrolyse des benzodiazépines et de leurs principaux métabolites ... 84
35231 - Spectrophotométrie d'absorption dans l'Ultra-Violet ... 84
35232 - Chromatographie sur couche-mince d'adsorbant ... 84
35233 - Chromatographie en phase gazeuse ... 85
35234 - Spectrofluorimétrie ... 85
35235 - Spectrophotométrie d'absorption dans le visible après diazocopulation ... 90
3524 - Composé obtenu par acétylation de la diamino-2,5 benzophénone ... 93

IV - APPLICATIONS TOXICOLOGIQUES ... 95
41 - Toxicité des dérivés de la benzodiazépine-1,4 utilisées en thérapeutique ... 95
42 - Problèmes posés par l'Analyse Toxicologique Hospitalière d'Urgence ... 96
43 - Recherche des dérivés de la benzodiazépine-1,4 dans les urines ... 97
431 - Principe ... 97
432 - Technique spectrophotométrique d'absorption après diazocopulation ... 97

4321 - Réactifs ... 97
4322 - Protocole opératoire ... 98
4323 - Résultats ... 99
4324 - Spécificité ... 100
43241 - Sulfamides ... 100
43242 - Acide para-amino-salicylique ... 101
43243 - Acétanilide ... 101
43244 - Aniline ... 101
43245 - Phénacétine ... 102
433 - Technique chromatographique sur couche-mince d'adsorbant ... 102
4331 - Réactifs et matériel ... 102
4332 - Protocole opératoire et résultats obtenus ... 103
434 - Exemples appliqués à la Toxicologie Hospitalière d'Urgence ... 105
435 - Remarques ... 107
44 - Dosage des dérivés de la benzodiazépine-1,4 dans les urines ... 107
441 - Chromatographie en phase gazeuse ... 108
442 - Cas particulier du tétrazépam ... 110

CONCLUSIONS ... 111

BIBLIOGRAPHIE ... 117

TABLE DES MATIERES ... 129

Vu et permis d'imprimer

Paris, le 08 MAI 1973

Le DOYEN

G. DILLEMANN